

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie**

**STUDIUM A ANALYTICKÉ VYUŽITÍ ELEKTROCHEMICKÝCH  
TRANSFORMACÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK**

# **DISERTAČNÍ PRÁCE**

Autor: Mgr. Pavla Macíková

Studijní obor: Analytická chemie, prezenční forma studia

Vedoucí disertační práce: prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

**Olomouc 2013**

Prohlašuji, že tuto disertační práci jsem vypracovala samostatně pod vedením mé konzultantky, paní RNDr. Jany Skopalové, Ph.D. a vedoucího práce prof. RNDr. Karla Lemra, Ph.D. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne .....

.....

Mgr. Pavla Macíková

Děkuji především paní RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a informace, ochotu a vstřícnost během celých čtyř let mého doktorského studia a také vedoucímu práce prof. RNDr. Karlu Lemrovi, Ph.D. Děkuji také RNDr. Barboře Papouškové, Ph.D., Mgr. Lukáši Kučerovi a doc. RNDr. Petru Bednářovi, Ph.D. za pomoc při měřeních na přístroji UPLC/MS, doc. RNDr. Davidu Jirovskému, Ph.D. a Mgr. Zdence Bartošové za pomoc při práci s přístrojem HPLC s elektrochemickou detekcí. Poděkování patří také RNDr. Petru Cankařovi, Ph.D. z Katedry organické chemie za syntézu 5-hydroxymethyltolterodinu a doc. RNDr. Janu Hrbáčovi, Ph.D. a Mgr. Vladimíru Halouzkovi, Ph.D. z Katedry fyzikální chemie za pomoc s amperometrickými experimenty. Děkuji závěrem doc. RNDr. Vítězslavu Maierovi, Ph.D. za poskytnutí látky tolterodinu a doc. RNDr. Petru Bartákovi za přispění a rady k této práci.

## Souhrn

V této disertační práci je sledováno elektrochemické chování dvou antimuskarinových léčiv, tolterodinu (TOL) a fesoterodinu (FES), a jejich společného aktivního metabolitu 5-hydroxymethyltolterodinu (5-HMT). Tato léčiva jsou komerčně dostupná pod názvem Detrol/Detrusitol (TOL) a Toviaz (FES) a používají se k léčbě urgentní inkontinence, naléhavé potřeby močení nebo zvýšené frekvence močení u pacientů s hyperaktivním močovým měchýřem. Také je studováno elektrochemické chování rutinu voltametričnými a amperometričnými technikami na uhlíkových pastových elektrodách (CPEs). Rutin je přírodně se vyskytující flavonoid, který našel uplatnění i ve farmacii například pro léčbu zvýšené lámavosti a propustnosti krevních vlásečnic.

Pro studium těchto antimuskarinik (dvou léčiv a jejich účinného metabolitu) byly nejdříve použity voltametričké techniky (cyklická, diferenční pulzní a square wave voltametrie). Oxidace všech tří látek je silně závislá na pH. TOL byl oxidován ve dvou ireverzibilních stupních, přičemž při  $\text{pH} \geq 6$  se objevoval třetí signál. Naproti tomu FES poskytoval pouze jeden ireverzibilní oxidační pík. V alkalickém prostředí docházelo k samovolné hydrolyze FES na 5-HMT. V záznamu cyklické voltametrie 5-HMT byly v anodické části patrné dva oxidační signály a v katodické oblasti jim odpovídající dva redukční píky.

Dále byla vyvinuta metoda chromatografické separace TOL, FES a 5-HMT pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí. Jako elektrochemické čidlo byla zvolena borem dopovaná diamantová elektroda. Z hlediska přiměřené retence a separace látek se jako mobilní fáze osvědčila směs acetonitril/fosfátový pufr o pH 7 a koncentraci 0,05 mol/l v poměru 30:70, v/v. Ze čtyř testovaných kolon bylo nejpriznivější separace dosaženo na koloně Nucleodur® CN-RP 3  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  2 mm I. D. Odhady mezí detekce se pohybovaly v jednotkách nmol/l. Tato metoda se může stát součástí postupu vhodného ke stanovení studovaných látek v moči nebo plazmě.

Za použití coulometrie za konstantního potenciálu byly TOL, FES a 5-HMT elektrochemicky oxidovány v různých prostředích a při různých potenciálech zvolených podle voltametričkých odezev látek v daném prostředí. Produkty elektrolyzy byly následně analyzovány metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC) a hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem a hybridním kvadrupólovým-průletovým analyzátozem. V elektrolyzovaných roztocích studovaných antimuskarinik byly nalezeny

produkty vznikající dehydrogenací, hydroxylací, methoxylací nebo dimerizací. Mezi produkty elektrochemické oxidace studovaných antimuskarinik byly nalezeny i látky vznikající metabolickou cestou v živých organismech.

Bylo studováno elektrochemické chování rutinu na třech uhlíkových pastových elektrodách (CPEs): nemodifikované (CPE), modifikované ftalocyaninem železnatým (IP/CPE) a s iontovou kapalinou 1-hexyl-3-methylimidazolium-bis(trifluoromethylsulfon)imidem jako pojivem uhlíkové pasty (IL/CPE). Modifikátor ftalocyanin železnatý se projevil elektrokatalytickým účinkem na oxidaci rutinu. Iontová kapalina zvyšovala proudovou odezvu rutinu se současným zvýšením proudového pozadí, což bylo zřejmě způsobeno zvětšením elektroaktivní plochy elektrody. Rutin byl silně adsorbován na povrch všech studovaných pracovních elektrod, což mohlo být využito ke zvýšení citlivosti použitím metody DPAdSV. Na IL/CPE bylo dosaženo meze detekce 5 nmol/l. Pro potlačení šumu amperometrických záznamů při použití studovaných CPEs byla vyvinuta pulzní amperometrická metoda, se kterou bylo navíc dosaženo nižších mezí detekce. Všechny testované CPEs jsou použitelné pro analýzu rutinu v reálných vzorcích, jak bylo prokázáno analýzou extraktů ze semen pohanky seté.

## Summary

An electrochemical behaviour of two antimuscarinic drugs, tolterodine (TOL) and fesoterodine (FES) and their active metabolite 5-hydroxymethyltolterodine (5-HMT) has been studied. The drugs are commercially available under the name Detrol/Detrusitol (TOL) and Toviaz (FES). They are indicated for the treatment of an overactive bladder with symptoms of urinary frequency, urgency or urge incontinence or any combination of these symptoms. Electrochemical behaviour of rutin was investigated on carbon paste electrodes (CPEs) using voltammetric and amperometric techniques. Rutin is naturally occurred flavonoid, which is useful in pharmacy for strengthening of blood capillaries.

Voltammetric study of three antimuscarinics (two drugs and their active metabolite) was performed using cyclic, linear sweep, differential pulse and square wave voltammetry. The oxidation of all three substances is pH dependent. TOL was oxidized in two irreversible steps. A third anodic signal of TOL was observed for  $\text{pH} \geq 6$ . FES provided one irreversible oxidation peak, but it was spontaneously hydrolyzed to 5-HMT in alkaline media. The oxidation of 5-HMT proceeded in two steps. Two corresponding reduction peaks appeared in cathodic scan of 5-HMT.

Chromatographic separation of TOL, FES and 5-HMT using HPLC with electrochemical detection was developed. Boron doped diamond electrode was chosen as an electrochemical sensor. Mobile phase consisted of acetonitrile and 0.05 mol/L aqueous phosphate buffer (pH 7) (30:70, v/v) provided a suitable separation and retention. Among four tested chromatographic columns, the best separation of the analytes was achieved with Nucleodur® CN-RP 3  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  2 mm I. D. Estimation of detection limits was in units of nmol/L. The method has a great potential for a determination of TOL, FES and 5-HMT in plasma or urine.

Three studied antimuscarinics were electrochemically oxidized using controlled potential electrolysis in different media at various values of applied potential. Oxidation products were subsequently analyzed using ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and mass spectrometry with electrospray ionization and quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry. Plenty of oxidation products were found in electrolyzed solutions of TOL, FES and 5-HMT including several dimers. Some metabolites produced by living organisms were among the products of electrooxidation of the antimuscarinic drugs.

Electrochemical behaviour of rutin was investigated on three carbon paste electrodes (CPEs): unmodified (CPE), iron (II) phthalocyanine modified CPE (IP/CPE) and CPE with ionic liquid 1-hexyl-3-methylimidazolium-bis(trifluoromethylsulfonyl)imide as a binder in carbon paste (IL/CPE). Iron (II) phthalocyanine as a CPE modifier revealed an mild electrocatalytic effect on the rutin oxidation. Strong adsorption of rutin observed on all electrode materials can be used for sensitivity improvement of voltammetric analysis by DPAdSV. Limit of detection 5 nmol/L was achieved with this technique on IL/CPE. Higher level of noise limits the usability of the studied electrodes to determine rutin by constant potential amperometry in stirred solution. To overcome this problem, a pulse amperometric method was applied and a detection limit in submicromolar concentration level of rutin using unmodified CPE was achieved. All three studied CPEs are applicable for determination of rutin in real samples as it was demonstrated on analysis of buckwheat seeds extract.

# Obsah

<b>SOUHRN</b> .....	<b>4</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>6</b>
<b>OBSAH</b> .....	<b>8</b>
<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
2.1. VÝVOJ ELEKTROCHEMICKÝCH TECHNIK.....	11
2.1.1. <i>Spojení elektrochemie s chromatografickými metodami</i> .....	11
2.1.2. <i>Spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií</i> .....	12
2.1.3. <i>Spojení elektrochemie s kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií (LC/MS)</i> .....	13
2.1.4. <i>Online vs. offline spojení elektrochemie s (LC/)MS</i> .....	14
2.1.5. <i>Spojení elektrochemie s jinými technikami</i> .....	15
2.1.6. <i>Miniaturizace elektrochemické cely</i> .....	15
2.2. CYKLICKÁ VOLTAMETRIE, NÁSTROJ POPISU ELEKTROCHEMICKÝCH PŘEMĚN.....	16
2.2.1. <i>Reverzibilita elektrochemických přeměn</i> .....	16
2.2.1.1. $E_r$ mechanismus (reverzibilní elektrodová reakce).....	17
2.2.1.2. $E_i$ mechanismus (ireverzibilní elektrodová reakce).....	18
2.2.1.3. <b>EC</b> proces.....	19
2.2.1.4. <b>ECE</b> proces.....	19
2.3. ELEKTROCHEMICKÉ PŘEMĚNY FENOLOVÝCH LÁTEK.....	20
2.4. ELEKTRODY NA BÁZI UHLÍKOVÉ PASTY.....	22
2.5. CHARAKTERISTIKA A VLASTNOSTI STUDOVANÝCH LÁTEK.....	24
2.5.1. <i>Tolterodin</i> .....	24
2.5.2. <i>Fesoterodin</i> .....	25
2.5.3. <i>5-hydroxymethyltolterodin</i> .....	26
2.5.4. <i>Metody stanovení studovaných antimuskarinik</i> .....	27
2.5.5. <i>Rutin</i> .....	28
<b>3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE</b> .....	<b>33</b>
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>34</b>
4.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	34
4.2. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	35
4.2.1. <i>Voltametrické a amperometrické experimenty</i> .....	35
4.2.2. <i>Vysokoučinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí</i> .....	35
4.2.3. <i>Elektrolýza za konstantního potenciálu</i> .....	36
4.2.4. <i>Analýza oxidačních produktů metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií</i> .....	36
4.2.5. <i>Stanovení rutinu v extraktech z pohanky</i> .....	36
4.2.6. <i>Další použité přístroje</i> .....	36
4.3. PRACOVNÍ POSTUPY.....	37



4.3.1.	<i>Syntéza 5-hydroxymethyltolterodinu</i> .....	37
4.3.2.	<i>Příprava uhlíkových pastových elektrod</i> .....	37
4.3.3.	<i>Voltametrické experimenty</i> .....	37
4.3.4.	<i>Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí</i> .....	38
4.3.5.	<i>Elektrolýza za konstantního potenciálu</i> .....	39
4.3.6.	<i>Analýza oxidačních produktů metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií</i> .....	39
4.3.7.	<i>Stanovení rutinu v extraktech z pohanky</i> .....	39
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>41</b>
5.1.	ELEKTROCHEMICKÉ CHOVÁNÍ ANTIMUSKARINIK .....	41
5.1.1.	<i>Elektrochemické chování tolterodinu</i> .....	41
5.1.2.	<i>Elektrochemické chování fesoterodinu</i> .....	44
5.1.3.	<i>Elektrochemické chování 5-hydroxymethyltolterodinu</i> .....	49
5.2.	SEPARACE ANTIMUSKARINIK VYSOKOÚČINNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRafiÍ S ELEKTROCHEMICKOU DETEKcí .....	54
5.2.1.	<i>Chromatografická separace</i> .....	54
5.2.2.	<i>Elektrochemická detekce</i> .....	56
5.2.3.	<i>Analýza modelové směsi za zvolených podmínek</i> .....	58
5.3.	ELEKTROLÝZA ANTIMUSKARINIK A ANALÝZA JEJICH OXIDAČNÍCH PRODUKTŮ METODOU ULTRAÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRafiÍ S HMTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ .....	60
5.3.1.	<i>Elektrolýza tolterodinu</i> .....	61
5.3.2.	<i>Elektrolýza fesoterodinu</i> .....	66
5.3.3.	<i>Elektrolýza 5-hydroxymethyltolterodinu</i> .....	68
5.4.	MECHANISMUS ELEKTROCHEMICKÉ OXIDACE ANTIMUSKARINIK .....	75
5.4.1.	<i>Mechanismus oxidace tolterodinu</i> .....	75
5.4.2.	<i>Mechanismus oxidace fesoterodinu</i> .....	76
5.4.3.	<i>Mechanismus oxidace 5-hydroxymethyltolterodinu</i> .....	77
5.5.	ELEKTROCHEMICKÉ CHOVÁNÍ RUTINU NA UHLÍKOVÝCH PASTOVÝCH ELEKTRODÁCH .....	78
5.5.1.	<i>Voltametrické chování rutinu na uhlíkových pastových elektrodách</i> .....	78
5.5.2.	<i>Voltametrické stanovení rutinu na uhlíkových pastových elektrodách</i> .....	81
5.5.3.	<i>Amperometrické stanovení rutinu na uhlíkových pastových elektrodách</i> .....	84
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>86</b>
	<b>SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>88</b>
	<b>LITERATURA</b> .....	<b>92</b>
	<b>CURRICULUM VITAE</b> .....	<b>112</b>
	<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>115</b>

# 1. Úvod

V každém žijícím organismu neustále probíhají chemické přeměny. Díky těmto přeměnám mohli lidé najít, či připravit léky proti nemocem, protilátky proti jedům vyskytujícím se v přírodě, zjistit důležitost antioxidantů, vitamínů nebo stopových prvků v organismu. Procesy zpracování látek *in vivo* se lidé pokouší simulovat různými metodami mimo tělo, *in vitro*.

Elektrochemie se do povědomí široké veřejnosti zapsala především díky českému fyzikálnímu chemikovi, objeviteli polarografie a zakladateli polarografické školy, nositeli Nobelovy ceny za chemii z roku 1959, Jaroslavu Heyrovskému. Jeho významný objev přispěl k velkému rozvoji elektrochemie a také její spojení s jinými technikami stále nachází své místo ve vědě. Elektrochemicky je možno napodobit některé procesy probíhající v organismu tak, že léčivo, či jiná látka je například coulometricky za konstantního potenciálu oxidována, nebo redukována. Produkty těchto elektrochemických přeměn je možno dále, nejlépe chromatograficky, separovat a následně detegovat hmotnostní spektrometrií.

Tato práce ukazuje několik možností využití elektrochemie jako nástroje simulace a popisu elektrochemických transformací biologicky aktivních látek a také jejich stanovení. Jsou popsány elektrochemické vlastnosti dvou antimuskarinových léčiv tolterodinu (TOL) a fesoterodinu (FES) a jejich společného aktivního metabolitu 5-hydroxymethyltolterodinu (5-HMT) pomocí voltametrických technik, jako například diferenční pulzní voltametrie, cyklické voltametrie nebo square wave voltametrie. Dále je studováno elektrochemické chování rutinu na uhlíkových pastových elektrodách voltametrickými a amperometrickými technikami. Také je ukázána možnost využití elektrochemie pro detekci TOL, FES a 5-HMT po jejich separaci kapalinovou chromatografií s borem dopovanou diamantovou elektrodou jako detekčním čidlem. Poslední aplikací elektrochemie je zde elektrochemická oxidace TOL, FES a 5-HMT za použití coulometrie za konstantního potenciálu s následnou analýzou produktů metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC) a hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem a hybridním kvadrupólovým-průletovým analyzátozem (Q-TOF).

## 2. Teoretická část

### 2.1. Vývoj elektrochemických technik

První aplikace elektrochemie jako samostatné analytické techniky je datována do roku 1922, kdy Jaroslav Heyrovský vydal první polarografickou publikaci na světě [1]. Došlo tak k rozvoji nejen v analýze kovů [2–4], ale také ve studiu organických látek a biomolekul, v té době konkrétně proteinů [5], vitamínů [6], alkaloidů [7,8], hormonů [9,10] nebo purinových bází [11]. Elektrochemie je silný a víceúčelový nástroj ke studiu malých molekul, ale i proteinů a je používána pro elektrochemickou detekci u separačních technik. Elektrochemický článek lze využít jako nástroj umožňující modelaci oxidačně redukčních reakcí probíhajících v biologických systémech. Například metabolismus léčiv nebo proteinů je velmi složitý enzymaticky řízený děj, přičemž pomocí elektrochemie je možno některé redoxní přeměny v organismu napodobit. S hmotnostní spektrometrií pak elektrochemie vytváří účinný nástroj detekce a stanovení produktů elektrochemických přeměn [12].

#### 2.1.1. *Spojení elektrochemie s chromatografickými metodami*

Už na konci sedmdesátých let minulého století našla elektrochemie své místo jako součást kapalinového chromatografu v podobě elektrochemického detektoru [13–15]. Na přelomu 80. a 90. let došlo ke strmému nárůstu počtu publikací na toto téma. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) s elektrochemickou detekcí byla využita ke stanovení biologicky aktivních látek, např. léčiv [16–18] a aminokyselin [19,20] v plazmě, moči nebo kostech. Elektrochemický detektor se uplatnil také u kapilární elektroforézy (CE) [21,22].

Výběr elektrodového materiálu pro elektrochemický detektor má vliv na citlivost i selektivitu. Jako elektrochemické senzory již byly u HPLC nebo CE použity uhlíková disková elektroda [23,24], uhlíkové vlákno [25,26], mikrodisková elektroda ze svazku uhlíkových vláken [27,28], uhlíková pastová elektroda [29,30], grafitová disková elektroda [31], platinová elektroda [32–34], zlatá elektroda [35,36], měděná elektroda [37,38] a chemicky modifikované elektrody [39–41].

Novinkami v amperometrických detektorech jsou borem dopovaná diamantová elektroda (BDD) nebo uhlíkové mikrovláknko. Několik prvních aplikací BDD elektrody jako

amperometrického detektoru pro HPLC bylo publikováno v roce 2002 pro detekci šesti tricyklických antidepresiv (imipraminu, desipraminu, clomipraminu, amitriptylinu, nortriptylinu a doxepinu) [42], homocysteinu [43] a chlorfenolů [44]. Později byl tento detektor využit v elektroforéze pro detekci nitroaromatických výbušnin, organofosfátových insekticidů a fenolů [45], aromatických aminů [46] a purinů [47]. Výhodou BDD elektrody je široké užité potenciálové okno ve vodném prostředí až do 3,5 V, nízký kapacitní odpor, vysoká chemická stabilita a nízké limity detekce až v jednotkách pmol [43,48]. Ještě mladším elektrochemickým senzorem je uhlíkové mikrovlákno, které vykazuje vynikající citlivost, stabilní signál a velmi široký rozsah použití [49].

I pro kapilární zónovou elektroforézu jsou vyvíjeny nové možnosti elektrochemické detekce jako například detektor zvaný „sheath-flow“ (detektor s přídavným tokem kapaliny). Kapilára je vložena do platinové trubičky, která má funkci uzemňovací elektrody pro elektroforetickou separaci a která navíc pomáhá při transportu tzv. přídavné kapaliny k pracovní elektrodě umístěné na konci kapiláry [50].

### 2.1.2. *Spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií*

První publikace popisující zapojení elektrochemické cely před hmotnostní spektrometr jsou datovány do roku 1971, kdy Bruckens a Raogadde studovali redoxní chování kyseliny chloristé za použití porézní platinové elektrody umístěné mezi elektrolytem a evakuovaným vstupem do hmotnostního spektrometru [51]. Za posledních 40 let dramaticky narůstá počet metod a aplikací spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií (EC/MS), ať už v online nebo offline zapojení.

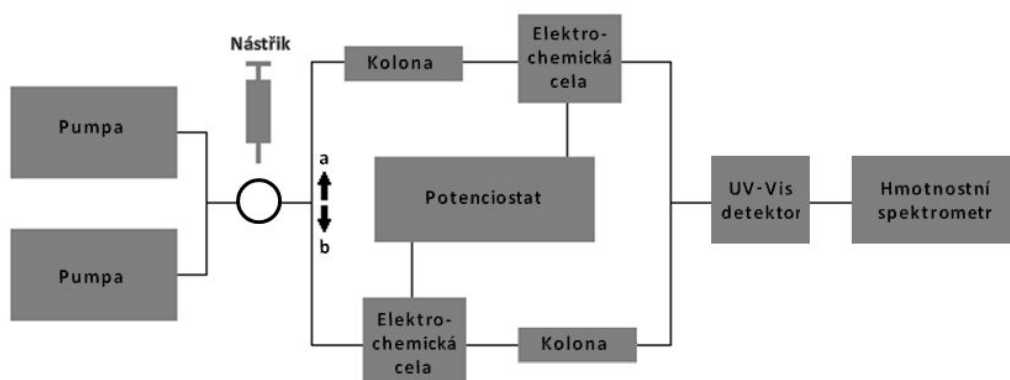
Pro spojení EC/MS bylo důležité najít vhodný iontový zdroj kompatibilní s elektrochemickou celou. V roce 1986 Hambitzer se svými kolegy poprvé použil jako iontový zdroj termosprej (TSP) k ionizaci netěkavých látek [52]. Pro EC/MS spojení byly poté použity v iontových zdrojích principy bombardování rychlými atomy (FAB) [53], chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) [54] a ionizace svazkem částic (PB) [55]. Dobře kompatibilním s EC se ukázal být iontový zdroj indukčně vázané plazma (ICP-MS) [56]. Však nejlépe vyhovující ionizační technikou se stal elektrosprej (ESI), který je od svého prvního použití v roce 1995 [57] nejrozšířenějším iontovým zdrojem pro EC/MS analýzy polárních, netěkavých a tepelně labilních látek. Toto spojení bylo úspěšně použito v mnoha různých oblastech výzkumu zahrnující metabolismus léčiv [58–61], analýzu proteinů [62], peptidů [63] a DNA [64], kvantifikaci biomolekul [65] nebo procesy předúpravy vzorku [66].

Z novějších technik byl pro EC/MS online spojení úspěšně použit desorpční elektrosprej [67]. Vzápětí si našel své místo v online EC/MS spojení také iontový zdroj rozprašující roztok z povrchu nanoelektrosprejem [68].

### 2.1.3. Spojení elektrochemie s kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií (LC/MS)

Zapojení separační techniky, kapalinové chromatografie (LC), mezi elektrochemickou celu a hmotnostní spektrometr (EC/LC/MS) může poskytnout zajímavé možnosti, i když bylo publikováno mnoho článků s odlišnými názory na výhody či nevýhody tohoto spojení. Existují dvě možnosti online zařazení LC do EC/MS systému (Obr. 2.1). Prvním je zapojení LC kolony před elektrochemickou celu, kdy směs látek je nejdříve rozdělena na jednotlivé sloučeniny, tyto látky jsou pak postupně elektrochemicky přeměněny a jejich produkty detegovány hmotnostní spektrometrií. Toto zapojení je nejvýhodnější pro směsi látek, které tvoří nejlépe jeden oxidační, resp. redukční produkt. Ve srovnání s elektrochemickou detekcí je LC/EC/MS kompatibilní s gradientovou elucí [69].

Druhou možností spojení kapalinové chromatografie s EC/MS je zařazení LC kolony za elektrochemickou celu. Toto uspořádání je výhodnější pro čistou látku, která je nejdříve elektrochemicky přeměněna, vzniklé produkty jsou separovány v LC systému a následně detegovány hmotnostní spektrometrií. Získáme tak užitečné informace například o polaritě jednotlivých oxidačních, resp. redukčních produktů, nebo jejich hmotnosti [69].



Obr. 2.1. Schematické zapojení LC/EC/MS (směr **a**) a EC/LC/MS (směr **b**), před hmotnostní spektrometr je navíc zařazen také UV-Vis detektor.

#### 2.1.4. *Online vs. offline spojení elektrochemie s (LC/)MS*

Pokud je elektrochemická cela v online spojení s hmotnostní spektrometrií, příp. navíc se separační technikou, produkty redoxní přeměny mohou být okamžitě a zcela automatizovaně analyzovány, příp. separovány [12]. Online spojení je vhodné pro detekci nestálých oxidačních, resp. redukčních produktů se sklonem k rychlé degradaci. Počet publikací s online zapojením EC/(LC/)MS každým rokem rapidně narůstá. Jedním z důvodů je možnost simulace metabolismu léčiv *in vitro* [69]. Skupina U. Karsta z Univerzity v Münsteru se rozsáhle zabývá studiem metabolismu biologicky aktivních látek za pomoci online spojení EC/(LC/)MS, např. alkaloidů galantaminu a lycorinu [60], diclofenacu, léčiva proti bolesti a zánětlivých onemocnění [70], verapamilu k léčbě hypertenze, anginy pectoris, srdeční arytmie nebo jako prevence migrény [71], tetrazepamu, uvolňovače svalů [72], toremifenu, modulátoru estrogenových receptorů [73], fenothiazinu, látky s tlumícím účinkem na centrální nervový systém [74] a mnoho dalších. Jsou však i jiné instituce ve světě zabývající se touto problematikou. Na univerzitě v Nantes ve Francii použili EC/LC/MS pro studium oxidativní degradace acetobutololu, betablokátoru k léčbě hypertenze a arytmie [75]. Vědci z Osaky v Japonsku pomocí metody online EC/ESI-MS studovali elektrochemickou oxidaci antipsychotika zotepinu [76]. Také na Univerzitě Palackého v Olomouci bylo publikováno EC/MS spojení pro ke studiu anthokyaninů [77]. Elektrochemické cely užívané pro online EC/(LC/)MS spojení jsou zpravidla shodné s těmi, které se používají jako elektrochemické detektory, viz kapitola 2.1.1.

Offline analýzy jsou vhodné v případech, kdy produkty elektrochemické transformace jsou stabilní, nebo naopak pokud chceme studovat degradace produktů elektrochemických přeměn například v určitých časových intervalech. Pro detekci labilních produktů je vhodnější online spojení EC/(LC/)MS, ale v případě extrémně nestálého produktu, který se rozpadá v řádu sekund, či ještě rychleji ani použití online spojení EC/(LC/)MS nemusí být efektivní. Na Groningenské univerzitě v Nizozemí se zabývali offline oxidací lidokainu, lokálního anestetika, s LC/MS analýzou produktů. Anodické oxidace byly prováděny v tříelektrodovém zapojení s platinovou diskovou pracovní elektrodou, Pt-drátkem jako pomocnou elektrodou a stříbrnou pseudo-referentní elektrodou [78]. Na Univerzitě Palackého v Olomouci byly offline EC/LC/MS identifikovány oxidační produkty berberinu, přírodního alkaloidu používaného pro léčbu gastroenteritidy, průjmu a cukrovky. Elektrochemické přeměny byly uskutečňovány za konstantního potenciálu v tříelektrodovém zapojení s velkoplošnou platinovou pracovní a pomocnou elektrodou a kalomelovou referentní elektrodou [59].

Pro úplný přehled elektrochemicky připravených produktů je ideální kombinace online a offline techniky EC/(LC/)MS, kdy můžeme využít všechny výhody dané metody a naopak potlačit nevýhody metody druhé. Produkty zaznamenané při online zapojení jsou podobné produktům připraveným elektrolýzou s následnou offline (LC/)MS analýzou. Vše záleží na elektrochemické aktivitě výchozích látek a na stabilitě produktů [79].

### 2.1.5. *Spojení elektrochemie s jinými technikami*

Pro studium metabolismu léčiv je vhodné také spojení elektrochemie s nukleární magnetickou resonancí (EC/NMR). Je jednoduchou cestou tvorby, detekce a popisu struktury meziproductů, které mohou vznikat *in vivo*. Nevýhodou je potřeba velké koncentrace pro NMR, zejména u látek s nižší elektrochemickou aktivitou. Pro dosažení přiměřeného poměru signál/šum, je nutná delší doba elektrochemické přeměny, což může naopak vést k rozkladu vysoce reaktivních oxidačních produktů a zabránit tak detekci v NMR. Řešením je kombinace EC/NMR a EC/MS, která může poskytnout jasnější informace o produktech elektrochemických transformací [80].

Byla použita kombinace elektrochemie s plynovou chromatografií a hmotnostní detekcí pro studium oxidačních produktů 2,4,6-tribromfenolu, fungicidu a meziproductu pro výrobu některých polymerních bromovaných zpomalovačů hoření na bázi tetrabrombisfenolu A [81].

### 2.1.6. *Miniaturizace elektrochemické cely*

Němečtí a nizozemští vědci vynalezli mikrofluidní mikroreaktor pro elektrochemické přeměny analytů. Tento čip byl zkonstruován z platinové pracovní a pomocné elektrody a paladiové referentní elektrody. Cyklické voltamogramy naměřili v objemu pouhých 9,6 nl. Tento mikročip použili ke studiu metabolické cesty amodiaquinu ve spojení EC/LC/MS. Stejná měření provedli také na komerčně dostupné elektrochemické cele a získali srovnatelné výsledky jako na mikročipu [82]. O rok později ti samí vědci použili tento mikročip s pseudo-referentní elektrodou s oxidem iridičitým, která má také sloužit pro simulaci oxidativního metabolismu léčiv [83].

## 2.2. Cyklická voltametrie, nástroj popisu elektrochemických přeměn

Cyklická voltametrie (CV) poskytuje bohaté informace o kinetice a termodynamice mnoha chemických systémů. Z cyklických voltamogramů můžeme zjistit například reverzibilitu elektrodového děje, difúzní, resp. adsorpční jevy nebo počet vyměněných elektronů při elektrochemické reakci. Záznam CV je závislostí proudové odezvy elektrolytu na potenciálu trojúhelníkového průběhu aplikovaného na pracovní elektrodu a skládá se z anodické (oxidační) a katodické (redukční) křivky. Je-li v elektrolytu obsažena elektroaktivní látka, dostáváme v záznamu oxidační resp. redukční signály ve tvaru píku. Vkládaný potenciál je vytyčen počátečním potenciálem  $E_i$  (z angl. initial), přepínacím potenciálem  $E_s$  (z angl. switching) a konečným potenciálem  $E_f$  (z angl. final). Z CV záznamu pak můžeme stanovit proudy anodického  $i_{p,a}$  a katodického píku  $i_{p,c}$  a jejich potenciály  $E_{p,a}$  a  $E_{p,c}$  [84,85].

Kvalitativní veličina, půlvlnový potenciál  $E_{1/2}$ , jehož hodnota se odečítá v polovině výšky polarografické vlny elektroaktivní látky, je u většiny organických látek závislý na pH. Ze závislosti  $E_{1/2}$  na pH je možno stanovit hodnotu disociační konstanty  $pK_a$ . Při pH roztoku rovnajícím se hodnotě  $pK_a$ , dochází ke změně sklonu směrnice závislosti  $E_{1/2} - \text{pH}$ . Odvozením od obecných vztahů závislosti mezi  $E_{1/2}$  a pH [86] dostáváme vztah (pro 20 °C):

$$E_{1/2} = E^{o'} - p \frac{0,058}{z} \text{pH}, \quad (\text{R. 1})$$

kde  $E^{o'}$  je normální redox potenciál,  $p$  je počet vyměněných protonů a  $z$  je počet vyměněných elektronů. Pokud se hodnota směrnice závislosti  $E_{1/2} - \text{pH}$  blíží 58 mV, při elektrochemické reakci dochází k výměně stejného počtu protonů a elektronů. Při výměně jednoho protonu a dvou elektronů bude hodnota směrnice poloviční (29 mV) [84,86].

### 2.2.1. Reverzibilita elektrochemických přeměn

Reverzibilitu elektrochemické reakce je možno určit z cyklického voltamogramu z rozdílu potenciálů v proudovém maximu anodického a katodického signálu  $\Delta E_p = |E_{p,a} - E_{p,c}|$ . Pro reverzibilní přenos elektronu je  $\Delta E_p = 57 - 60$  mV, přičemž záleží na zvoleném přepínacím potenciálu  $E_s$ . V praxi se však tato hodnota pohybuje v rozmezí 60–70 mV z důvodu drobných deformací v důsledku odporového efektu v elektrolytu a elektronického nebo matematického vyhlazování křivek. Pro víceelektronový přenos je



rozdíl mezi potenciály anodického a katodického píku roven  $58/n$  (pro  $20\text{ }^\circ\text{C}$ ), kde  $n$  je počet vyměněných elektronů. Pokud je rozdíl potenciálů redoxních píků  $58\text{ mV}$  a děj je čistě difúzní, dochází k výměně jednoho elektronu. Kvalitativní veličina, normální redox potenciál je pak roven  $E^{\circ'} = (E_{p,a} + E_{p,c})/2$ . Podíl katodického a anodického proudu píku by měl být pro reverzibilní děj jednotkový  $i_{p,c}/i_{p,a} = 1$  [84].

Elektrochemický děj se skládá z elektrodové a chemické reakce, přičemž obě probíhají při různých rychlostech, s odlišnými rychlostními konstantami a navzájem se ovlivňují. Mechanismus elektrochemických reakcí bývá tedy popisován tzv. **E & C** zápisem, kde **E** představuje jednoelektronový přenos  $e^-$  a **C** značí chemickou reakci roztoku úzce spojenou s elektrodovou reakcí [84].

### 2.2.1.1. $E_r$ mechanismus (reverzibilní elektrodová reakce)

Podstata fyzikálních procesů zodpovědná za tvar elektrochemicky reverzibilního cyklického voltamogramu je založena na Nernstově a Fickově zákoně. Nernstův zákon (Rovnice 2) definuje podíl koncentrace oxidované  $[A]_{x=0}$  a redukované  $[B]_{x=0}$  formy u povrchu elektrody pro redukční proces  $A + n e^- \rightleftharpoons B$  jako funkci aplikovaného napětí  $E_t$  a normálního redox potenciálu  $E^{\circ'}$ , kde  $t$  je čas,  $n$  počet vyměněných elektronů,  $F$  Faradayova konstanta,  $R$  molární plynová konstanta a  $T$  absolutní teplota. Fickův druhý zákon difúzního transportu hmoty k plošné elektrodě (Rovnice 3) zahrnuje difúzní koeficient  $D$  a parametr  $x$  je vzdálenost od elektrodového povrchu [85].

$$\frac{[A]_{x=0}}{[B]_{x=0}} = e^{\frac{nF}{RT}(E_t - E^{\circ'})} \quad (\text{R. 2})$$

$$\frac{d[A]}{dt} = D \frac{d^2[A]}{dx^2} \quad (\text{R. 3})$$

Pokud je přenos elektronu příliš pomalý s ohledem na časový průběh experimentu, pro koncentrace na elektrodovém povrchu neplatí Nernstova rovnice, což způsobuje posun potenciálu k negativnějším hodnotám pro redukci a pozitivnějším pro oxidaci. Byla formulována kritéria pro hodnocení reverzibility děje pomocí standardní rychlostní konstanty  $k_r^\circ$  pro  $D = 10^{-5}\text{ cm}^2/\text{s}$  a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ : pro reverzibilní děj  $k_r^\circ > 0,3\text{ v}^{1/2}\text{ cm/s}$ , pro kvazireverzibilní děj  $k_r^\circ > 2 \cdot 10^{-5}\text{ v}^{1/2}\text{ cm/s}$  a pro ireverzibilní děj  $k_r^\circ < 2 \cdot 10^{-5}\text{ v}^{1/2}\text{ cm/s}$ , kde  $v$  je rychlost scanu [84].

Teoretický výpočet proudu píku  $i_p$  pro reverzibilní přenos elektronu je definován jako funkce rychlosti scanu  $v$  a vychází z Randles-Ševčíkovy rovnice (Rovnice 4). Tato rovnice může být přepsána do tvaru (Rovnice 5) při 25 °C, kde  $c$  je koncentrace oxidované formy. Pokud známe počet vyměněných elektronů  $n$ , může být z této závislosti spočítán difúzní koeficient  $D$ , nebo naopak při známém  $D$  můžeme zjistit počet vyměněných elektronů  $n$ . Jestliže chceme stanovit aktivní plochu elektrody  $A$ , stačí vzít látku o známé hodnotě  $D$  a  $n$  (např. ferocen) a z Randles-Ševčíkovy rovnice plochu vypočítat [84,85].

$$i_p = 0,4463nFA \left[ \frac{nF}{RT} \right]^{1/2} c D^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{R. 4})$$

$$i_p = 2,686 \times 10^5 n^{3/2} c D^{1/2} v^{1/2} A \quad (\text{R. 5})$$

Kromě již zmíněných kritérií pro reverzibilní děj,  $\Delta E_p \approx 58/n$  mV (při 20 °C),  $i_{p,c}/i_{p,a} = 1$ , by proud píku  $i_p$  měl být úměrný druhé odmocnině rychlosti scanu  $\sqrt{v}$ . Z této závislosti můžeme usuzovat o **difúzně-adsorpčních** procesech. Směrnice lineární závislosti  $\log i_p$  vs.  $\log v$  je blízká hodnotě 0,5 pro difúzí kontrolovaný proces, hodnota směrnice 1 značí adsorpční proces. Hodnoty směrnice mezi 0,5 a 1 naznačují difúzně-adsorpční děj. Adsorpce také závisí na koncentraci látky v roztoku. Závislost pokrytí povrchu elektrody na koncentraci je u nižších koncentrací lineární, při vyšších koncentracích dochází k odklonu od linearitu z důvodu pokrytí celého povrchu elektrody a závislost nabývá hyperbolického tvaru adsorpční izotermy [84].

#### 2.2.1.2. $E_i$ mechanismus (ireverzibilní elektrodová reakce)

Pro ireverzibilní mechanismus je charakteristické  $|i_{p,a}/i_{p,c}| < 1$  pro redukční proces a  $|i_{p,c}/i_{p,a}| < 1$  pro oxidační proces. S desetinásobnou změnou rychlosti scanu dojde k posunu potenciálu píku  $|\Delta E_p| = \ln(10) \frac{RT}{2\alpha nF} = 30/\alpha n$  mV (pro 25 °C). Pro ireverzibilní reakci je  $i_p$  úměrné  $\sqrt{v}$  podle Randles-Ševčíkovy rovnice:

$$i_p = 0,496\sqrt{\alpha n'} nFAc \sqrt{\frac{FvD}{RT}}, \quad (\text{R. 5})$$

kde  $\alpha$  je koeficient přenosu náboje  $n'$  je počet elektronů přenesených v reakčním kroku určujícím rychlost, zatímco  $n$  udává celkový počet přenesených elektronů na molekulu difundující k elektrodovému povrchu a  $c$  je koncentrace elektroaktivní látky v roztoku [85].

### 2.2.1.3. EC proces

Elektrodovou reakci často doprovází následná chemická reakce, která může ovlivnit celkovou reverzibilitu elektrochemického procesu. Děj můžeme považovat za **reverzibilní**, pokud je elektrodová reakce rychlá a chemická reakce pomalá (oxidační, resp. redukční produkt elektrodové transformace je redukován, resp. oxidován dříve, než by došlo k chemické přeměně). **Ireverzibilní** děj nastane, pokud je elektrodová reakce pomalá a chemická reakce naopak rychlá (oxidační, resp. redukční produkt elektrodové transformace je chemicky přeměněn dříve, než by mohlo dojít ke zpětné redukci, resp. oxidaci). Kinetiku elektrodového děje je možno ovlivnit rychlostí scanu  $\nu$ . Pokud máme  $E_rC_i$  mechanismus (reverzibilní elektrodová, ireverzibilní chemická reakce), se zvyšováním  $\nu$  se bude zvyšovat reverzibilita děje až do mezní hodnoty  $\nu$ , kdy bude plně reverzibilní. Pokud by docházelo ke snižování rychlosti chemické reakce dané rychlostní konstantou  $k_{\text{chem}}$  při konstantní rychlosti scanu, reverzibilita děje by také narůstala. Ke zpětné elektrodové reakci by tak docházelo dřív, než by stihla proběhnout chemická reakce a celý děj by tak byl elektrochemicky reverzibilnější [84].

U  $E_rC_i$  mechanismu je poměr katodického a anodického proudu píku je funkcí chemické rychlostní konstanty  $k_{\text{chem}}$  a rychlosti scanu  $\nu$ . Analýzou cyklických voltamogramů lze získat odhad rychlostní konstanty chemické reakce. Pokud je poměr katodického a anodického proudu píku roven dvěma, odhad  $k_{\text{chem}} \approx RT/2nF\nu$ . Potenciál píku (pro  $k_{\text{chem}}RT/nF\nu > 4$ ) je dán rovnicemi [84,85]:

$$E_p = E^{o'} - \frac{RT}{nF} 0,780 + \frac{RT}{2nF} \ln \left[ \frac{k_{\text{chem}}RT}{nF\nu} \right] \text{ (pro redukci)} \quad (\text{R. 6a})$$

$$E_p = E^{o'} + \frac{RT}{nF} 0,780 - \frac{RT}{2nF} \ln \left[ \frac{k_{\text{chem}}RT}{nF\nu} \right] \text{ (pro oxidaci)} \quad (\text{R. 6b})$$

### 2.2.1.4. ECE proces

Pokud dochází k dalšímu přenosu  $e^-$ , reakční proces se stává složitějším. Po elektrodové reakci následuje chemická reakce, jejíž produkt je elektrochemicky aktivní a může být oxidován, resp. redukován na elektrodě. Navíc ještě může docházet k interakcím mezi produkty jednotlivých reakcí, např. produkt následné chemické reakce může reagovat s produktem jeho elektrochemické přeměny. V úvahu tedy přichází několik případů interakcí (*Schéma 1*). Diagnostická kritéria k jednotlivým případům lze nalézt v literatuře [85].

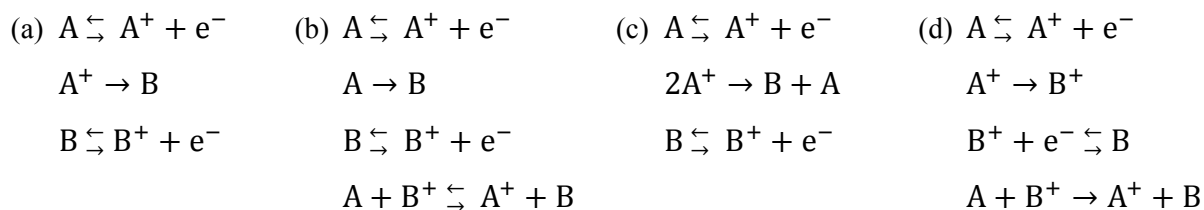


Schéma 1 Příklady ECE reakčních schémat [85]

## 2.3. Elektrochemické přeměny fenolových látek

Mechanismus anodické oxidace fenolu nebo substituovaných fenolů je poměrně složitý. Hydroxylační reakce hrají rozhodující roli, ale jsou zároveň propojeny s dalšími reakcemi vzniklých fenoxo radikálů reagujících za vzniku dimerů nebo polymerních produktů. Neméně důležitý je i použitý potenciál elektrolýzy, koncentrace, pH prostředí a další. Kvantitativní studie oxidací fenolů jsou ztěžovány tvorbou polymerních filmů na elektrodovém povrchu. Po prvním voltametričtém scanu je elektroda téměř elektro-inaktivní. Řešením je práce s nízkými koncentracemi (0,1 – 0,5 mmol/l) nebo použití 25 % acetonu ve vodném pufru [87,88].

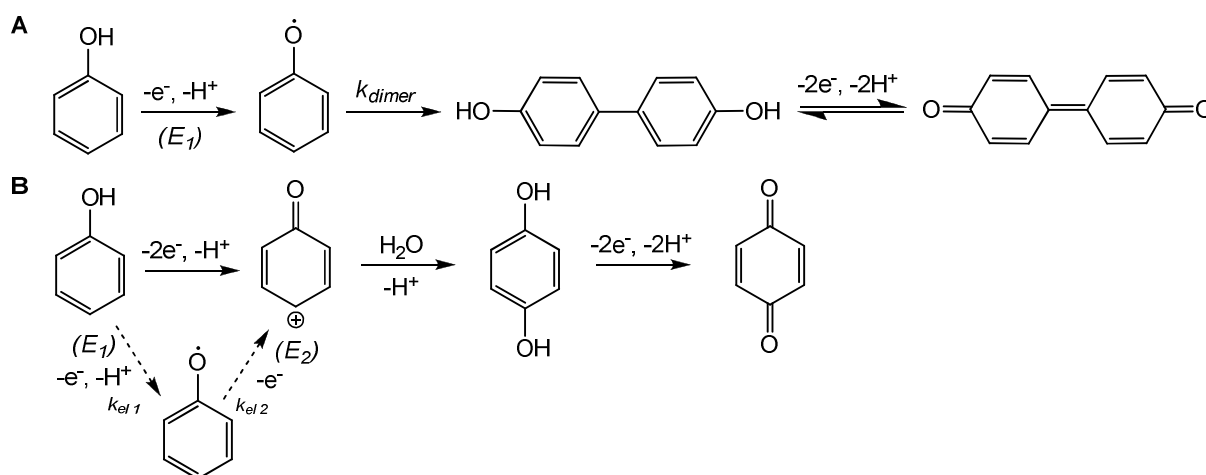


Schéma 2 Zjednodušený proces oxidace fenolu [88]

Oxidace samotného **fenolu** může probíhat dvěma cestami (Schéma 2). Při nižším potenciálu ( $E_1$ ) převládá vznik fenoxo radikálu, který rychle dimerizuje na 4,4'-bifenol a ten se pak velmi ochotně oxiduje na bifenochinon (Schéma 2A). Tato cesta je typickým ECE procesem. Při vyšším potenciálu ( $E_2$ ) dominuje oxidace fenolu přes fenoxo radikál až na fenoxoniový kation, který podléhá hydroxylaci za vzniku hydrochinonu a ten je dále oxidován na *p*-benzochinon (Schéma 2B). Vznik dimeru přes uhlík a kyslík je zde také možný, ale jen velmi minoritně [88].

Oxidační proces **1-naftolu** probíhá obdobnými cestami jako u fenolu. Při nižším potenciálu ( $E_1$ , 0,75 V) vzniká přednostně dimer (Schéma 3A). Při vyšším potenciálu ( $E_2$ , 1 V) vzniká primárně 1,4-dihydroxynaftalen (Schéma 3B). U **2-naftolu** byla pozorována elektrochemická přeměna pouze na 1,2-dihydroxynaftalen. Ke vzniku dimeru v tomto případě nedochází z důvodu značné nestability *ortho*-dimerů [88].

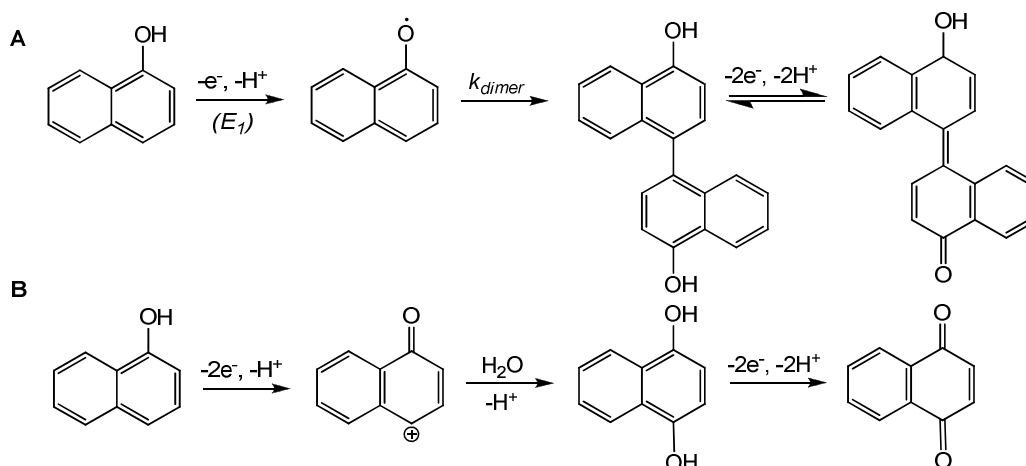


Schéma 3 Zjednodušený proces oxidačního mechanismu 1-naftolu [88]

Oxidace **2-substituovaných hydrochinonů** (Schéma 4, I) je dvouelektronová a vede ke vzniku *p*-chinonů, které často podléhají nukleofilnímu ataku. Nukleofil obvykle reaguje Michaelovou 1,4-adiční reakcí vedoucí k tvorbě substituovaných hydrochinonů. U hydrochinonů substituovaných v poloze 2 skupinou odčerpávající elektrony ( $R = -COOH, -NO_2, -CHO, -COCH_3$ ) dochází k hydroxylaci v poloze 3 za vzniku trihydroxy sloučeniny. Poměr  $i_p/\sqrt{v}$  roste se snižující se rychlostí scanu  $v$ , což odpovídá ECE procesu. Oxidace **katecholu** (II) v kyselém prostředí vede po dvou minutách elektrolýzy ke vzniku odpovídajícího *o*-chinonu (1,2,3-trihydroxybenzenu), avšak pokud je katechol elektrolyzován déle (1 hodinu) dochází k elektrooxidaci na 1,2,4-trihydroxybenzen. **4-methylkatechol** (III) podléhá hydroxylaci až po dlouhodobější elektrolýze a to do polohy 5 (IV). U katecholů probíhá na elektrodě ve všech pH sekundární reakce za vzniku C–C dimeru v polohách 5 (V) [87].

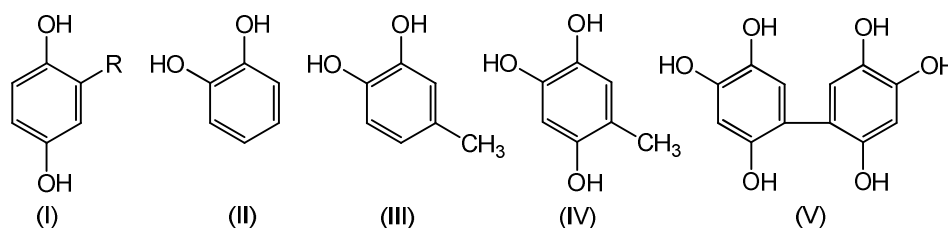


Schéma 4 Struktury fenolových látek: 2-substituovaný hydrochinon (I), katechol (II), 4-methylkatechol (III), 5-methylbenzen-1,2,4-triol (IV) a dimerní hydroxylovaný katechol (V) [87].

Při dvouelektronové anodické oxidaci **2,6-ditercbutyl-*p*-kresolu** (Schéma 5, I) dochází k tvorbě kationtu, kam se následně může navázat nukleofilní činidlo (např.  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OCH}_3$ ) v závislosti na prostředí, ve kterém reakce probíhá (Schéma 5, II a III) [89]. Stejný princip oxidace platí také pro **2,4,6-tritercbutylfenol** [90].

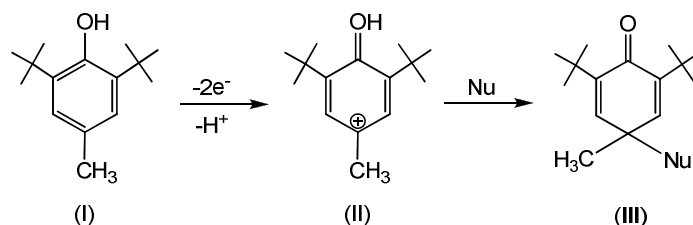


Schéma 5 Anodická oxidace 2,6-ditercbutyl-*p*-kresolu [89]

## 2.4. Elektrody na bázi uhlíkové pasty

Uhlíková pastová elektroda (CPE) původně vznikla jako alternativa ke rtuťové kapkové elektrodě. Nabídla možnost anodické oxidace pomocí elektrody s obnovitelným povrchem. Největší výhodou CPE je možnost její modifikace a tím zvýšení její selektivity a citlivosti. Modifikátor může sloužit také jako katalyzátor elektrochemické reakce analytu. Nejběžnějším způsobem modifikace CPE je přimíchání modifikátoru do celého objemu pasty nebo může být modifikátor adsorbován na povrch CPE. Méně používaný způsob modifikace je tvorba kovalentních vazeb s funkčními skupinami [91,92].

Modifikátory CPE je možné rozdělit do několika skupin: měniče iontů a adsorbenty (zeolity a pryskyřicové katexy pro akumulaci těžkých kovů, pryskyřicové anxy pro stanovení jodidů), organické modifikátory (1,10-fenantrolin a jeho deriváty, oximy a dimethylglyoximy vhodné pro analýzu nikelnatých nebo kobaltnatých iontů), kovové komplexy (ftalocyanin kobaltnatý, zinečnatý, železnatý nebo měďnatý, porfíny, berlínská modř), modifikátory využívané v biosenzorech (oktaldehyd s  $\text{NAD}^+$ , křenová peroxidasa, glukosooxidasa, řasy) [92]. Do uhlíkové pasty již byly přimíchány a využity k měření mechy, lišejníky, tabák, z ovoce např. ananas, banán, jablko, dále také houby, bakterie, viry a mnoho dalších [93].

Často používanými modifikátory uhlíkových pastových elektrod bývají ftalocyaninové komplexy kovů (MPc), které mohou mít elektrokatalytický efekt na redoxní reakce různých látek. Například ftalocyaninové komplexy železa (FePc) mohou katalyzovat elektroredukce kyslíku [94], organických peroxidů [95], oxidu siřičitého [96], dusitanů [97] nebo fotoredukce oxidu uhličitého [98]. MPc mohou katalyzovat také elektrooxidace mnoha molekul [99]. Například byla pozorována elektrokatalytická aktivita FePc (ftalocyaninu železnatého (IP),

tetrasulfoftalocyaninu železnatého a tetraaminoftalocyaninu železnatého) jako modifikátorů CPE na oxidaci dopaminu a serotoninu. U ftalocyaninových komplexů niklu a kobaltu elektrokatalytický efekt na oxidaci dopaminu a serotoninu naopak pozorován nebyl. Centrem elektrokatalytické aktivity MPc je právě ion kovu v komplexu. Mechanismus katalytické oxidace látky za použití MPc je založen na oxidaci MPc následované přenosem elektronu z látky na oxidovaný MPc. MPc obsahující elektroaktivní kov jako železo nebo kobalt mají zpravidla lepší katalytickou aktivitu než například nikl a měď. U FePc elektrochemicky generovaný vyšší oxidační stav železa v komplexu (z Fe<sup>II</sup> na Fe<sup>III</sup>) podporuje oxidaci látek [100]. Ftalocyaninem železnatým modifikovaná CPE (IP/CPE) byla použita k voltametričkému stanovení adrenalinu, kyseliny askorbové a kyseliny močové. Použitý modifikátor prokázal elektrokatalytickou aktivitu u všech tří látek a umožnil dobré oddělení píků při měření v jejich směsi [101]. Další studie prokázaly elektrokatalytickou aktivitu IP/CPE na redoxní reakci kyseliny askorbové [102], epinefrinu [103] nebo elektrooxidaci amitrolu [104]. FePc vynikají elektrokatalytickou aktivitou pro širokou škálu látek, proto byl v této disertační práci použit IP jako modifikátor CPE pro stanovení rutinu.

Jako modifikátor CPE lze využít také iontovou kapalinu (IL). Tyto látky vynikají výbornou elektrickou vodivostí, ve vodě jsou téměř nerozpustné, vůči jiným chemikáliím jsou inertní a odolávají vysokým teplotám s takřka zanedbatelným tlakem par. Mohou přispívat ke zlepšení voltametričkého signálu, zvýšení citlivosti měření a mohou sloužit jako katalyzátory některých elektrochemických reakcí. Základní strukturu mnoha ILs tvoří heterocyklický kation (*N*-alkylpyridinium nebo *N,N*-dialkylimidazolium) a anion (např. BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, AlCl<sub>4</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, [(CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N<sup>-</sup> = Tf<sub>2</sub>N<sup>-</sup>], [(C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N<sup>-</sup> = Pf<sub>2</sub>N<sup>-</sup>]) [105–107]. Příkladem aplikace uhlíkové pastové elektrody modifikované iontovou kapalinou *N*-butylpyridinium hexafluorofosfátem je elektrokatalytická oxidace dopaminu, neurotransmiteru, jehož nedostatek může způsobovat Parkinsonovu chorobu. Ve srovnání s nemodifikovanou CPE byly odezvy i proudové pozadí elektrody s IL (IL/CPE) mnohem vyšší [108]. Jiná IL/CPE s 1-butyl-3-methylimidazolium-bis(trifluoromethylsulfonyl) imidem jako pojivem, na jejíž povrch byl elektropolymerizován monomer *O*-anisidinu, projevila vysokou účinnost na elektrokatalytickou oxidaci formaldehydu v alkalickém prostředí [109]. Byl vyvinut biosenzor adrenalinu, CPE obsahující enzym laktasu z houby *Aspergillus oryzae* v celém objemu uhlíkové pasty. Jako pojivo sloužila směs Nujolu a IL (1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorofosfátu, BMI PF<sub>6</sub> nebo 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl) imidu, BMI Tf<sub>2</sub>N). Vyšší odezvu adrenalinu poskytovala elektroda s BMI Tf<sub>2</sub>N ve srovnání

s elektrodou obsahující BMI PF<sub>6</sub>. Bylo dosaženo meze detekce 0,53 μmol/l [110]. V této disertační práci byla připravena CPE, v níž byla jako pojivo použita iontová kapalina 1-hexyl-3-methylimidazolium-bis(trifluoromethylsulfonyl)imid. Jde o dosud první aplikaci této IL jako modifikátoru CPE [111].

## 2.5. Charakteristika a vlastnosti studovaných látek

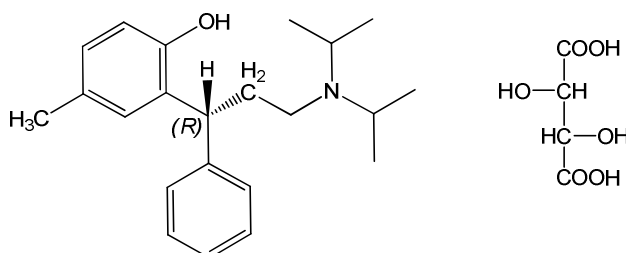
### 2.5.1. Tolterodin

Tolterodin (TOL) je látka řazená do skupiny antimuskarinových léčiv, které uvolňují svalovinu močového měchýře. Existují dvě enantiomerní formy tolterodinu (*R*) a (*S*), které vykazují mírně odlišné biologické účinky. Opticky čistý (*S*)-TOL má necholinergní spasmolytické vlastnosti (uvolnění křečí hladkého svalstva), ale s absencí anticholinergního efektu (blokace účinku acetylcholinu způsobujícího kontrakce močového měchýře). Navíc u něj byly prokázány slabé sedativní účinky. (*S*)-TOL umožňuje léčbu střevních poruch a urgentní inkontinence (UII) způsobenou necholinergním mechanismem a je vhodný pro pacienty, u kterých antimuskarinový efekt (*R*)-izomeru může způsobovat nežádoucí vedlejší účinky například na paměť. Naproti tomu opticky čistý (*R*)-TOL vykazuje anticholinergní aktivitu a umožňuje tak léčbu UII vycházející z muskarinové hyperaktivity. Studiemi byl zjištěn vyšší léčivý účinek (*R*)-TOL než (*S*)-TOL nebo racemátu (*RS*)-TOL, proto je (*R*)-TOL používán pro výrobu léčiva s komerčním názvem Detrol nebo Detrusitol a je předepisován k léčbě UII, naléhavé potřeby močení nebo zvýšené frekvence močení u pacientů s hyperaktivním močovým měchýřem. V těchto tabletách se TOL vyskytuje ve formě tartrátu s chemickým názvem (*R*)-*N,N*-diisopropyl-3-(2-hydroxy-5-methylfenyl)-3-fenylpropanamin 1-hydrogen tartrát (Obr. 2.2) s elementárním složením C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>7</sub> a molární hmotností 475,57 g/mol. Sumární vzorec volné báze tolterodinu je C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>NO s molární hmotností 325,49 g/mol a přesnou hmotností 325,2406 Da [112–114].

Metabolizace tolterodinu se po orálním podání odehrává v játrech. Primární metabolická cesta je vedena přes oxidaci methylové skupiny prostřednictvím isoenzymu cytochromu P450 2D6 za vzniku majoritního farmakologicky aktivního metabolitu 5-hydroxymethyltolterodinu (5-HMT), který vykazuje srovnatelnou antimuskarinovou aktivitu s tolterodinem. Sekundárně dochází k metabolizaci na 5-karboxylovou kyselinu tolterodinu (5-CAT), za přítomnosti cytochromu P450 3A4 dochází k dealkylaci všech forem



tolterodinu za vzniku *N*-dealkylovaného tolterodinu, *N*-dealkylovaného 5-HMT a *N*-dealkylované 5-CAT. Z těla je 80 % léčiva vyloučeno močí v metabolizované podobě a méně než 1 % původní látky odchází v nezměněné podobě [112,115].

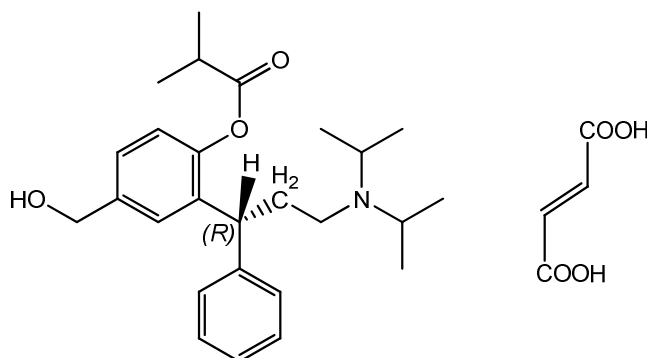


Obr. 2.2. Strukturální vzorec (*R*)-tolterodin L-tartrátu

Tolterodin je bílý krystalický prášek s teplotou tání 206 – 212 °C, omezeně rozpustný ve vodě (12 mg/ml), dobře rozpustný v methanolu, mírně rozpustný v ethanolu a obtížně rozpustný v toluenu. Disociační konstanta tolterodinu je  $pK_a = 9,87$  [112].

### 2.5.2. Fesoterodin

Fesoterodin (FES) je stejně jako tolterodin antagonista muskarinových receptorů uvolňující svalovinu močového měchýře. Také fesoterodin se vyskytuje ve dvou enantiomerních formách (*R*) a (*S*). V podobě (*R*)-fesoterodin fumarátu (Obr. 2.3) je zatím velmi krátce dostupný pod komerčním názvem Toviaz a podobně jako TOL se používá k léčbě UII, naléhavé potřeby močení nebo zvýšené frekvence močení u pacientů s hyperaktivním močovým měchýřem.



Obr. 2.3. Strukturální vzorec (*R*)-fesoterodin fumarátu

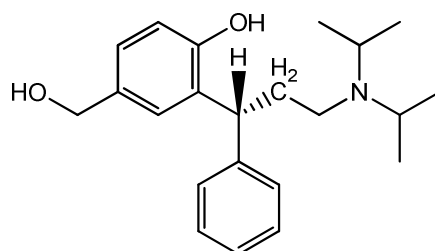
Chemický název léčiva je hydrogen fumarát (*R*)-2-(3-diisopropylamino-1-fenylpropyl)-4-(hydroxymethyl)fenylesteru kyseliny izomáselné s elementárním složením  $C_{30}H_{41}NO_7$  a molární hmotností 527,65 g/mol. Sumární vzorec volného fesoterodinu je  $C_{26}H_{37}NO_3$  s molární hmotností 411,58 g/mol a přesnou hmotností 411,2773 Da [116,117].

Hlavním metabolitem fesoterodinu je 5-HMT stejně jako u tolterodinu. Liší se však svojí metabolickou cestou. FES se po orálním podání v těle hydrolyzuje na 5-HMT pomocí nescifických esteraz, v důsledku čehož je velmi rychle a rozsáhle přeměněn a tudíž je oproti TOL v plazmě téměř nedetekovatelný. 5-HMT vykazuje vysokou antimuskarinovou aktivitu a velkou měrou přispívá k aktivitě léčiva obsahujícího FES. Následné metabolity 5-HMT jsou pak už méně aktivní. Léčivé tablety obsahující FES, ve srovnání s TOL, vykazují vyšší účinnost při snížení počtu inkontinenčních příhod, zmírnění symptomů UUI, zvýšení kapacity močového měchýře a vyšší rychlost účinku léčiva „diary-dry rate“ [118,119].

Fesoterodin fumarát je bílý až šedobílý prášek s teplotou tání 105 °C,  $pK_a = 10,31$  (při teplotě 23,4 °C) a je dobře rozpustný v methanolu (574 mg/ml), vodě (542 mg/ml), acetonu (205 mg/ml), 0,9 % roztoku NaCl (551 mg/ml), omezeně rozpustný v toluenu (0,14 mg/ml) a téměř nerozpustný v heptanu (0,03 mg/ml) [116].

### 2.5.3. 5-hydroxymethyltolterodin

5-hydroxymethyltolterodin (5-HMT) je velmi silný antagonist muskarinových receptorů. Sám o sobě není podáván jako léčivo, vzniká jako produkt metabolismu tolterodinu (přes cytochrom P450 2D6) a fesoterodinu (hydrolyzou nescifickými esterazami) a velkou měrou tak přispívá k jejich antimuskarinové aktivitě. Samotný 5-HMT je v játrech dále metabolizován dvěma cestami za účasti cytochromu P450 2D6 a P450 3A4, kdy vzniká inaktivní (1) karboxy, (2) karboxy-*N*-deisopropyl a (3) *N*-deisopropyl metabolit. Po podání fesoterodinu je 70 % vyloučeno močí v podobě 5-HMT (16 %), karboxy metabolitu (34 %), karboxy-*N*-deisopropyl metabolitu (18 %) a *N*-deisopropyl metabolitu (1 %), stolicí pak odchází 7 % podané dávky [120,121].



Obr. 2.4. Strukturální vzorec (*R*)-5-hydroxymethyltolterodinu

5-HMT je šedobílý prášek s teplotou tání 52–53 °C dobře rozpustný v chloroformu, dimethylsulfoxidu (68 mg/ml) a ethanolu (68 mg/ml) a omezeně rozpustný ve vodě (< 1 mg/ml). Chemický název 5-HMT je (*R*)-2-(3-(diisopropylamino)-1-fenylpropyl)-4-

(hydroxymethyl)fenol (Obr. 2.4) s elementárním složením  $C_{22}H_{31}NO_2$ , molární hmotností 341,49 g/mol a přesnou hmotností 341,2355 Da [122,123].

#### 2.5.4. *Metody stanovení studovaných antimuskarinik*

Nejčastěji používanou analytickou technikou pro stanovení tolterodinu a jeho metabolitů včetně 5-HMT je vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí. Příkladem jsou tři studie stanovení TOL a 5-HMT v lidské plazmě s různými podmínkami. Švédští vědci v roce 2005 prováděli toto stanovení na koloně  $C_{18}$  (5  $\mu$ m, 150  $\times$  2 mm) při 40 °C s mobilní fází  $CH_3CN/0,01M-CH_3COONH_4$  (1:1, v/v), s ionizací elektrosprejem (ESI) a kvadrupólovým analyzátozem [124]. Kolonu Hypersil silica (3  $\mu$ m, 30  $\times$  4 mm) s mobilní fází 0,02M- $CH_3COONH_4/CH_3CN$  (30:70, v/v), ionizaci ESI a trojitý kvadrupól (QqQ) použil Macek a kol. v roce 2009 [125]. Indičtí vědci o rok později použili také techniku HPLC/ESI-QqQ-MS/MS, kolonu  $C_{18}$  (5  $\mu$ m, 100  $\times$  4,6 mm) při 40 °C s mobilní fází 0,01M- $HCOONH_4/CH_3CN$  (35:65, v/v). Novější publikace dosáhla oproti předešlým studiím snížení množství spotřebované plasmy na analýzu (300  $\mu$ l), nejkratší doby analýzy a navíc metodu použili ke studii bioekvivalence na 41 zdravém člověku po orálním podání 2 mg léčiva v tabletě [126].

HPLC s UV detekcí byla kvůli nižší citlivosti využívána pro stanovení TOL a 5-HMT v tabletách léčiva. Tyto látky nejlépe absorbují při vlnové délce 210 nebo 220 nm [127–129]. Pomocí HPLC/UV na chirálních stacionárních fázích je možno oddělení enantiomerů TOL, což dovoluje stanovit (*S*)-TOL jako nečistotu v léčivu obsahujícím (*R*)-TOL [130,131]. Z dalších analytických technik byla pro stanovení TOL a 5-HMT použita plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS) s nutností derivatizace [132], kapilární elektroforéza (CE) [133,134] a rovněž byly pro tyto látky navrženy spektrofotometrické metody [135–137].

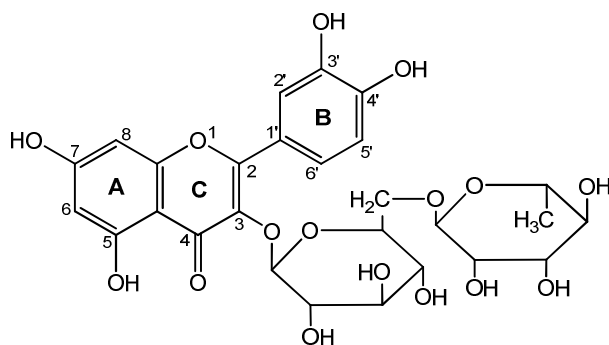
Pro stanovení FES v tabletách léčiva byla doposud použita HPLC/ESI-MS/MS na reverzních fázích Luna  $C_8$  (3  $\mu$ m, 50  $\times$  3 mm) s mobilní fází methanol/0,1 % kyselina mravenčí (90:10, v/v) [138]. Rychlá a levná UV spektrofotometrická metoda (228 nm) byla vyvinuta pro stanovení FES v léčivých tabletách a byla srovnána s třemi validovanými metodami LC, CE a LC/MS/MS s podobnými výsledky [139]. Degradční produkty fesoterodinu za různých podmínek (kyselé, bazické, oxidativní, teplotní a fotolytické) byly studovány a charakterizovány LC/UV/ESI-MS na monolitické koloně. Fesoterodin se rozkládal na látky o *m/z* 342,5 (5-HMT); 356,6; 175,2; 284,5; 365,7 a 393,4. V kyselém

prostředí 1M–HCl byla zjištěna degradace 10 % FES, ve 2M–HCl 32 % FES [140]. Pro stanovení FES a 5-HMT v lidské plazmě byla navržena metoda LC/ESI-MS/MS pro rozsah koncentrací analytů 0,01 – 10 ng/ml, na koloně Kromasil C<sub>18</sub> (5 μm, 100 × 4,6 mm) termostátované na 30 °C s mobilní fází 0,015M–HCOONH<sub>4</sub> (upraven kyselinou mravenčí na pH 5,5)/CH<sub>3</sub>CN (25:75, v/v) [141].

Elektrochemické chování TOL je součástí této disertační práce podpořené publikací [142]. Elektrochemické chování FES a 5-HMT dosud nebylo popsáno a je součástí této disertační práce.

### 2.5.5. *Rutin*

Rutin je řazen mezi nejbioaktivnější flavonoidy z podskupiny flavonolů. Je popsáno široké spektrum příznivých účinků rutinu v lidském organismu, které jsou podpořeny jeho silnou antioxidační aktivitou. Bylo zaznamenáno jeho protizánětlivé [143], antibakteriální [144], nebo gastroprotektivní působení [145], dále neuroprotektivní efekt u Parkinsonovy choroby [146], ochranný účinek proti poškození DNA [147], dále snižuje hladinu cholesterolu v krvi [148], ochraňuje kardiovaskulární systém [149] a obecně příznivě působí při léčbě chorob s produkcí volných kyslíkových radikálů např. revmatoidní artritida [150].



Obr. 2.5. Struktura rutinu

Struktura rutinu (Obr. 2.5) je tvořena necukernou složkou, aglykonem, kterou představuje kvercetin a na ten je přes kyslík v kruhu C v poloze 3 navázán disacharid rutinosid zastupující cukernou část rutinu. Proto je též rutin nazýván jako kvercetin-3-O-rutinosid. Jedná se o krystalickou látku se žlutým zabarvením, které může působením světla postupně hnědnout. Krystaly rutinu běžně obsahují molekuly vody. Dehydratovanou formu by bylo možné získat po dvanácti hodinách sušení při 110 °C. Rutin je dobře rozpustný v pyridinu, formamidu, méně v alkoholech, vodě, acetonu, ethylacetátu a téměř nerozpustný

v chloroformu, etheru a benzenu. Elementární složení rutinu je  $C_{27}H_{30}O_{16}$  s molární hmotností 610,52 g/mol a přesnou hmotností 610,1534 Da [151].

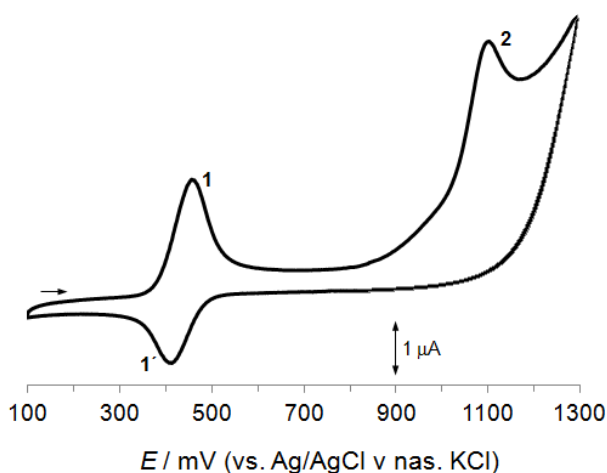
Rutin je v těle primárně metabolizován střevními bakteriemi za odtržení glykosylů na kvercetin-3-*O*-glukosid a následně na kvercetin, rovněž velmi silný antioxidant, který svými účinky doplňuje rutin v jeho bioaktivitě. Dalšími metabolity rutinu jsou 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina, 4-hydroxyfenyloctová kyselina, floroglucinol a 3,4-dihydroxybenzaldehyd [152].

Rutin je ve značném množství přítomen v rostlinách, ovoci a zelenině. Velmi bohatým zdrojem rutinu je pohanka. Množství rutinu v této rostlině závisí na mnoha faktorech. Existuje několik druhů pohanky, které se liší množstvím obsaženého rutinu. Největší množství rutinu bylo nalezeno v pohance tatarské (*Fagopyrum tataricum*), méně v pohance seté (*Fagopyrum esculentum*) a nejméně v pohance divoké (*Fagopyrum homotropicum*) [153]. Množství obsaženého rutinu také závisí na místě růstu pohanky. V oblasti s intenzivnějším dopadem slunečního záření bude rostlina obsahovat více rutinu. Zároveň osvětlenější část rostliny, např. květenství a stonek, bude bohatší na rutin, než např. kořen, protože rostlina se produkcí flavonoidů, které pohlcují dopadající UV záření, chrání před sluncem [154]. Rutin je dále přítomen v nepřeberném množství plodin, jako jsou citrusy, švestky, jablka, borůvky, maliny, česnek, petržel, fenykl, třezalka, zelený, černý, mátový čaj, ječmen, chmel a tedy i pivo. Přítomnost rutinu byla zjištěna v řadě českých i zahraničních piv přičemž průměrný obsah se pohyboval kolem 0,5 mg na 1 l piva [155].

Rutin je nejčastěji stanovován kapalinovou chromatografií s UV-Vis [156,157], hmotnostní [158], elektrochemickou [159], nebo chemiluminiscenční detekcí [160]. Byl stanovován také hmotnostní spektrometrií MALDI-MS [161], MALDI-TOF-MS [162], ESI-MS/MS [163]. Dále byla pro stanovení rutinu použita rovněž plynová chromatografie s hmotnostní detekcí avšak s nutností derivatizace směsí BSTFA/pyridin/ethylacetát (20:5:25, v/v/v) [164]. I kapilární elektroforéza byla hojně užívanou metodou pro stanovení rutinu [165]. Ze spektrálních metod byly pro analýzu rutinu použity UV spektrofotometrie [166], NMR [167], povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS) [168], infračervená spektroskopie [168,169].

Rutin je stejně jako ostatní flavonoidy elektroaktivní. Jeho elektrochemické chování dobře popisuje cyklický voltamogram (Obr. 2.6). První anodická vlna s maximem při potenciálu 460 mV odpovídá dvouelektronové oxidaci hydroxylových skupin s účastí dvou protonů v kruhu B v polohách 3' a 4', jejímž produktem je *o*-chinon. Této reverzibilní reakci

odpovídá redukční signál s maximem při potenciálu 430 mV. Druhý oxidační pík při 1080 mV odpovídá ireverzibilní reakci, jíž se účastní hydroxylové skupiny v kruhu A v polohách 5 a 7 [170,171]. Jiná studie popisuje druhý oxidační signál rutinu jako přeměnu –OH skupiny v poloze 7 a vznik kyslíkového volného radikálu směřující k tvorbě molekuly O<sub>2</sub>, který může být dále oxidován při ještě pozitivnějším potenciálu, což může vést k otevření cyklu C [172]. Nejnovější studie mechanismu oxidace kvercetinu, tvořícího necukernou složku rutinu, popisuje třístupňovou oxidaci ve vodném roztoku o pH 5,3. Kvazireverzibilní dvouelektronová oxidace hydroxylových skupin v polohách 3',4' kruhu B je následována hydrolyzou vzniklého produktu a tvorbou 2-(3',4'-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2*H*)-onu, který podléhá další oxidaci. V prostředí neutrálním a alkalickém byla pozorována reverzibilní jednoelektronová oxidace kvercetinu vedoucí k tvorbě dimeru. V přítomnosti kyslíku jsou oba uvedené oxidační produkty nestálé a hlavním oxidačním produktem je 3,4-dihydroxybenzoová kyselina [173].



Obr. 2.6. Cyklický voltamogram 0,1 mmol/l rutinu v Britton-Robinsonově pufru o pH 4,5, rychlost scanu 100 mV/s.

Kromě cyklické voltametrie byly pro studium rutinu využity i jiné elektroanalytické techniky, například diferenční pulzní voltametrie (DPV), square-wave voltametrie (SWV), linear sweep voltametrie (LSV) [174], chronocoulometrie [175], chronopotenciometrie [176] a voltabsorptometrie [172], metoda kombinující CV a spektrofotometrii.

Jedním z cílů této práce je studium chování rutinu na modifikovaných uhlíkových pastových elektrodách. V literatuře je k nalezení řada publikací zabývajících se voltametriickým stanovením tohoto flavonoidu na uhlíkových pastových elektrodách.

Byl studován vliv pH, potenciálu akumulace a přídavného činidla na prekoncentraci devíti flavonoidů včetně rutinu na povrchu CPE bez modifikace. Nejlepší voltametrickou odezvu poskytoval rutin v prostředí B-R pufru o pH = 5. V tomto prostředí byl nalezen potenciál akumulace  $E_{ak} = +0,2$  V (vs. SCE), při němž měl rutin o koncentraci 0,04  $\mu\text{mol/l}$  nejlepší signál ( $t_{ak} = 1$  min). Přidávky různých činidel (např. želatina, Triton X-405, dioktysulfosukcinát sodný, Carbovax 4000 a další) do měřeného roztoku rutinu potlačovaly adsorpci rutinu konkurenční adsorpcí činidel na povrch CPE [177].

Pro voltametrické stanovení a rozlišení fenolových látek včetně rutinu byla použita CPE modifikovaná silikagelem. Byla zjištěna dobrá reprodukovatelnost pracovního povrchu elektrody. Nejvyšší citlivost stanovení fenolických látek byla pozorována právě u rutinu. Takto modifikovaná CPE byla využita k DPV analýze reálných vzorků čaje, vína a brambor. Vzorky byly analyzovány přímo nebo po hydrolýze. Kyselou hydrolýzou vzorků čaje a vína došlo k rozkladu přítomné glykosidické vazby a byl pozorován nárůst píku kvercetinu [178].

K charakterizaci voltametrického chování a antioxidační aktivity čtyř flavonoidů včetně rutinu byla použita CPE modifikovaná povrchovou vrstvičkou DNA (DNA/CPE). U kvercetinu, katechinu a epigallokatechin galátu byl pozorován nárůst signálu na DNA/CPE v porovnání s CPE. Naopak u rutinu byl zaznamenán pokles proudové odezvy na DNA/CPE způsobený nejspíše sterickými problémy velké molekuly rutinu [179].

Dále byla pro stanovení rutinu vyvinuta CPE modifikovaná poly(vinylpyrrolidonem) (PVP), který zvyšoval adsorpci rutinu na elektrodový povrch v důsledku tvorby vodíkové vazby mezi imidovou skupinou PVP a hydroxyskupinou rutinu. Nejlepší analytická odezva byla získána při složení uhlíkové pasty: uhlíkový prášek, Nujol a PVP v poměru 75:15:10 (m/m/m) za podmínek  $t_{ak} = 10$  min, rychlosti polarizace 100 mV/s. Základním elektrolytem byl fosfátový pufr o pH = 6 a koncentraci 0,1 mol/l. Byla zjištěna mez detekce 0,15  $\mu\text{mol/l}$ . Elektroda byla použita pro stanovení rutinu ve farmaceutických preparátech [180].

Elektrochemické chování rutinu na CPE modifikované iontovou kapalinou (IL/CPE) 1-amyl-3-methylimidazolium bromidem bylo studováno v prostředí B-R pufru o pH = 3,3 metodami CV, DPV, SWV. Tato elektroda projevila elektrokatalytickou aktivitu k redoxní reakci rutinu a bylo dosaženo meze detekce 0,01  $\mu\text{mol/l}$  [181]. Jiná IL/CPE s *N*-butylpyridinium hexafluorofosfátem (BPPF<sub>6</sub>) vykazovala také silný elektrokatalytický efekt na oxidaci rutinu. Proud píku rutinu vzrostl 27,5 krát ve srovnání s CPE a bylo dosaženo meze detekce 0,36  $\mu\text{mol/l}$  [182]. Další CPE použité pro stanovení rutinu s modifikátorem DNA měla jako pojivo uhlíkové pasty parafinový olej a IL 1-butyl-3-methylimidazolium

hexafluorofosfát. S touto elektrodou bylo dosaženo meze detekce 1,3 nmol/l. Tato elektroda byla citlivější ve srovnání s DNA/CPE bez IL a selektivnější než nemodifikovaná CPE [183].

Novinkou a stále oblíbenějším uhlíkovým materiálem pro CPE jsou mnohostěnné uhlíkové nanotrubičky (CNTPE). Tato elektroda byla použita pro stanovení rutinu za použití DPV a bylo dosaženo meze detekce 0,03  $\mu\text{mol/l}$ . Optimální složení uhlíkové pasty bylo uhlíkové nanotrubičky a minerální olej v poměru 60:40 (m/m) [184]. S touto elektrodou bylo prováděno také stanovení směsi rutinu a kvercetinu za použití reverzní DPV. Na rozdíl od klasické GCE bylo možné oddělit signály rutinu a kvercetinu [185]. Také byl vyvinut nový biosenzor pro rutin, CPE s molekulárně předtištěným polymerem s mnohostěnnými uhlíkovými nanotrubičkami (MIP-MWNPE). S touto elektrodou bylo metodou SWV dosaženo meze detekce 0,05  $\mu\text{mol/l}$  [186]. Jiná CNTPE byla pokryta vrstvičkou nanočástic zlata. Velký povrch a dobrá vodivost tohoto senzoru umožnila citlivou detekci rutinu. Mez detekce 0,04 nmol/l je prozatím nejnižší mez detekce pro rutin dosažená elektroanalytickými metodami [187].

Všechny výše uvedené práce využívají pro stanovení rutinu voltametrické techniky. V předkládané disertační práci je popsáno stanovení tohoto flavonoidu na uhlíkových pastových elektrodách také pomocí amperometrických technik [111].



### 3. Cíle disertační práce

Cílem disertační práce bylo studium elektrochemických transformací biologicky aktivních látek. Konkrétně byly naplánovány tyto úkoly:

- prostudovat elektrochemické vlastnosti, chování a mechanismus oxidace antimuskarinových léčiv, tolterodinu a fesoterodinu, a jejich společného aktivního metabolitu 5-hydroxymethyltolterodinu voltametrickými technikami
- separovat tyto látky pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí na borem dopované diamantové elektrodě s ohledem na pozdější aplikace metody pro stanovení těchto léčiv v moči a plazmě
- připravit produkty oxidace těchto látek elektrolýzou za konstantního potenciálu a následně je analyzovat pomocí UPLC/ESI-MS
- vyhodnotit hmotnostní spektra produktů a navrhnout jejich strukturu
- z výsledků voltametrických měření a UPLC/ESI-MS analýz navrhnout mechanismus elektrochemické oxidace tolterodinu, fesoterodinu a 5-hydroxymethyltolterodinu
- sledovat vliv modifikace uhlíkové pasty na elektrochemické chování rutinu
- vyvinout čidlo pro amperometrickou detekci rutinu

Kromě předložené disertační práce jsou výsledky obsahem dvou publikací v impaktovaných časopisech [111,142].

## 4. Experimentální část

### 4.1. Použité chemikálie

Zásobní roztoky antimuskarinových léčiv a rutinu byly připraveny rozpuštěním naváženého množství tolterodin tartrátu (Zentiva, Praha, ČR), (*R*)-fesoterodin fumarátu (99 %, IS Chemical Technology, Čína), 5-hydroxymethyltolterodinu (syntéza popsána v kapitole 4.3.1) a rutin hydrátu ( $\geq 94$  %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) v methanolu p.a. čistoty (Lach-Ner, Neratovice, ČR). Jako srovnávací látky u elektrochemického stanovení 5-HMT byly použity 4-(hydroxymethyl)fenol (99 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), 4-hydroxybenzaldehyd (98 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) a syntetizovaný *p*-benzochinon. Jako vnitřní standard pro separaci látek vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí byl použit berberin hemisulfát ( $\geq 95$  %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo).

Octan amonný (p.a.,  $> 98,0$  %, Lach-Ner, Neratovice, ČR) a chloristan lithný ( $\geq 98,0$  %, Fluka, Neu-Ulm, Švýcarsko) byly použity pro přípravu roztoků základních elektrolytů. Britton-Robinsonovy (B-R) pufrů byly připraveny z kyseliny trihydrogenfosforečné, octové a trihydrogenborité (všechny o koncentraci 0,04 mol/l, p.a., Lachema, Brno). Požadované pH B-R pufrů bylo nastaveno hydroxidem sodným (0,2 mol/l, p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR). Octanový pufr byl připraven titrací kyseliny octové (0,1 mol/l) hydroxidem sodným. Rutin byl stanovován v extraktech loupaných semen pohanky seté (PROBIO, Staré Město, ČR)

Na přípravu mobilních fází byly použity hydrogenfosforečnan sodný, dihydrogenfosforečnan sodný, kyselina fosforečná (vše o čistotě TraceSelect, Fluka AG, Buchs, Švýcarsko), acetonitril HPLC čistoty (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), methanol HPLC čistoty (Merck, Darmstadt, Německo) a ultračistá voda (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

Uhlíkové pastové elektrody byly připraveny z grafitových vloček (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) a parafinového oleje (farmaceutická čistota) nebo iontové kapaliny 1-hexyl-3-methylimidazolium-bis(trifluoromethylsulfonyl)imid [hmin][Tf<sub>2</sub>N] (98 %, Merck, Darmstadt, Německo). Ftalocyanin železnatý ( $\geq 97$  %, Fluka, Neu-Ulm, Švýcarsko) sloužil jako modifikátor uhlíkové pasty.

## 4.2. Přístrojové vybavení

### 4.2.1. Voltametrické a amperometrické experimenty

Voltametrické experimenty byly prováděny na Eco-Tribo-polarografu se softwarem Polar.Pro verze 4 (Polarosensors, Praha, ČR) nebo na přístroji Autolab se softwarem NOVA 1.8 (Metrohm Autolab, Nizozemí). Amperometrické experimenty byly prováděny v míchaném roztoku na elektrochemické stanici CHI1660 (CH Instruments, Austin, TX, USA). Tříelektrodotový systém zahrnoval pracovní elektrodu ze skelného uhlíku (GCE, průměr 3,0 mm, Bioanalytical Systems, USA), nebo uhlíkovou pastovou elektrodu (CPE) při analýzách rutinu, platinovou drátkovou pomocnou elektrodu, nasycenou kalomelovou referenční elektrodu (SCE) pro měření ve vodném a methanolickém prostředí, referenční elektrodu Ag/AgNO<sub>3</sub> (0,1 mol/l v CH<sub>3</sub>CN) pro roztoky v acetonitrilu nebo referenční elektrodu Ag/AgCl/1M-KCl při analýzách rutinu.

### 4.2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí

Systém vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s elektrochemickou detekcí se skládal z ESA izokratické pumpy (Model 582, ESA Inc., Chelmsford, MA, USA) s tlumičem pulzů a manuálním dávkovacím ventilem s dávkovací smyčkou 25 µl (Rheodyne, Cotati, CA, USA). Elektrochemická detekce byla zajištěna coulometrickým detektorem Coulochem III, s coulometrickou celou s porézní grafitickou uhlíkovou elektrodou (Model 5010 A), nebo amperometrickou celou s borem dopovanou diamantovou elektrodou (Model 5040) v kombinaci s ochrannou celou (Model 5020, vše ESA Inc., Chelmsford, MA, USA). Jako referenční detektor byl za elektrochemickou celou sériově zapojen UV detektor Pye Unicam PU 4025 (PYE UNICAM, Cambridge, UK). Pro sběr a vyhodnocení chromatografických záznamů byl použit software Clarity (DataApex, Praha, ČR). Vzorby byly nastříkovány pomocí skleněné stříkačky o objemu 25 µl (Hamilton, Reno, NV, USA). V rámci optimalizace chromatografických podmínek byly studované látky separovány na čtyřech různých kolonách: Ascentis<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 3 µm, 100 × 2,1 mm I. D. (Supelco, Bellefonte, PA, USA), Nucleodur<sup>®</sup> C<sub>8</sub> Gravity 5 µm, 250 × 2 mm I. D., Nucleodur<sup>®</sup> PFP 5 µm, 250 × 2 mm I. D. a Nucleodur<sup>®</sup> CN-RP 3 µm, 125 × 2 mm I. D. (vše Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Německo). Všechny kapiláry, spojovací ferule a dávkovací smyčka byly vyrobeny z materiálu PEEK<sup>™</sup>. Pro filtraci fosfátových pufrů byla použita filtrační aparatura s porézním filtrem 0,2 µm (Millipore, Merck, Darmstadt, Německo).

#### 4.2.3. *Elektrolýza za konstantního potenciálu*

Aparatura pro elektrolýzu za konstantního potenciálu se skládala z OH-404 potenciostatu (Radelkis, Budapešť, Maďarsko) s tříelektrodovým systémem elektrod: velkoplošná platinová síťková pracovní elektroda, platinová pomocná elektroda umístěná v odděleném katodovém prostoru a referentní elektroda SCE pro methanolové a vodné roztoky, nebo Ag/AgNO<sub>3</sub> (0,1 mol/l v CH<sub>3</sub>CN) pro roztoky v acetonitrilu.

#### 4.2.4. *Analýza oxidačních produktů metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií*

Pro analýzu oxidačních produktů byl použit Aquity UPLC systém (Waters, Milford, Manchester, UK) vybavený směšovačem mobilních fází, autosamplerem, termostatem chromatografických kolon a PDA detektorem. Separace byla provedena na chromatografické koloně Vertex Plus 1,8 μm, 50 × 2 mm, Blue Orchid (Knauer, Berlín, Německo). Pro potvrzení předpokládaných struktur oxidačních produktů a pro určení sumárního vzorce byl za UPLC systém zařazen hmotnostní spektrometr QqTOF Premier (Waters, Milford, Manchester, UK) s ionizací elektrosprejem. Data byla sbírána a vyhodnocována softwarem MassLynx 4.1 (Waters, Milford, Manchester, UK).

#### 4.2.5. *Stanovení rutinu v extraktech z pohanky*

Extrakce rutinu byly prováděny superkritickým fluidním extraktorem SEKO-K (SEKO-K, Brno, ČR) a vysokotlakým extraktorem *one* PSE (Applied Separations, Bellevue, WA USA). Srovnávací měření obsahu rutinu v extraktech z pohanky bylo prováděno s HPLC systémem Waters 600S (Waters, Milford, Manchester, UK) s UV-Vis detektorem (typ 486), pumpou (typ 616) a smyčkou 20 μl. Detekce byla prováděna při vlnové délce 236 nm. Pro separaci za laboratorní teploty byla použita kolona Tessek (C18, 205 mm × 4,0 mm I.D., 5,0 μm, Separon, Praha, ČR). Mobilní fáze obsahovala methanol/vodu/kyselinu octovou (55:44:1, v/v/v). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,4 ml/min. Data byla sbírána a vyhodnocována v programu Clarity software (DataApex, Praha, ČR).

#### 4.2.6. *Další použité přístroje*

UV/VIS spektrofotometr Lambda 25 (Perkin Elmer, USA) byl použit pro spektrofotometrické určení disociační konstanty rutinu a měření spektra *p*-benzochinonu.

Příprava tlumivých roztoků a ověřování pH vzorků bylo prováděno na pH-metru inoLab 720 s kombinovanou skleněnou elektrodou SenTix 21 (WTW, Německo).

### 4.3. Pracovní postupy

#### 4.3.1. *Syntéza 5-hydroxymethyltolterodinu*

Fesoterodin fumarát (102 mg, 0,19 mmol) byl rozpuštěn v ethanolu (10 ml). Bylo přidáno 10 ml amoniaku (25 %) a reakční směs byla 48 hodin míchána za laboratorní teploty. Bílá sraženina byla odfiltrována, promyta vodou a vysušena vzduchem. Celkem bylo získáno 55 mg produktu (výtěžek 83 %). Identita produktu byla zjištěna hmotnostní spektrometrií.

#### 4.3.2. *Příprava uhlíkových pastových elektrod*

Uhlíková pasta byla připravena smícháním 200 mg grafitových vloček s 80  $\mu$ l parafinového oleje. CPE s ftalocyaninem železnatým (IP/CPE) byla připravena náhradou 10 % hmotnosti grafitových vloček ftalocyaninem železnatým. CPE s iontovou kapalinou (IL/CPE) byla připravena z 200 mg grafitových vloček a 100  $\mu$ l iontové kapaliny [hmin][Tf<sub>2</sub>N]. Každá směs byla homogenizována do vzniku soudržné pasty. Pastou bylo naplněno teflonové elektrodové pouzdro se závitem (vnitřní průměr 2 mm).

#### 4.3.3. *Voltametrické experimenty*

Před každým měřením byla GCE leštěna na navlhčené jemné textilii za použití 0,05 mm aluminu (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) a vložena na 10 s do ultrazvukové lázně. Elektrodový povrch CPE byl obnovován před každým scanem odstraněním malého množství pasty vytlačené pístem z elektrodového rezervoáru. Elektrodový povrch CPEs byl leštěn na hladkém papíře. Cyklické voltamogramy byly zaznamenávány při rychlosti scanu 50 nebo 100 mV/s. Při měření závislosti na rychlostech scanu byla rychlost scanu variována v různých rozsazích, konkrétní hodnoty jsou uvedeny u jednotlivých experimentů. Diferenční pulzní voltametrické experimenty byly prováděny při modulační amplitudě 0,05 V, době trvání pulzu 100 ms a rychlosti scanu 20 mV/s. Square wave voltamogramy byly zaznamenávány při rychlosti scanu 125 mV/s, amplitudě 0,02 V, době trvání pulzu 40 ms a frekvenci 25 Hz. Všechny experimenty byly prováděny v nízkoobjemové nádobce s maximálním objemem 2 ml. V případě potřeby byly elektrolyty před měřením probublány dusíkem.

Mez detekce a stanovitelnosti pro TOL a FES a pro amperometrické experimenty s rutinem byly vypočítány podle přímé metody signálu (IUPAC), která využívá intervalů spolehlivosti odhadů  $Y$  (odezvy měřicího přístroje) [188], ve statistickém programu QC Expert (TriloByte Statistical Software, Pardubice, ČR). Jako regresní model je použita přímka, hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ . Směrnice lineárních závislostí („Slope“) a jejich směrodatné odchylky („Standard Error“) byly počítány v programu OriginPro 8 SR0 (OriginLab Corporation, Northhampton, MA, USA). Odhad meze detekce a stanovitelnosti rutinu pro DPV a DPAdSV byly určeny experimentálně jako trojnásobek (LOD) nebo desetinásobek (LOQ) šumu základního elektrolytu, další parametry těchto kalibračních závislostí byly počítány v programu OriginPro 8 SR0. Přesnost a správnost měření rutinu bylo vyhodnocováno z modelových vzorků rutinu přidáním 2 ml, 0,4 ml a 0,06 ml standardního roztoku rutinu o koncentraci 1 mmol/l do octanového pufru (pH = 4) v destilované vodě o celkovém objemu 1000 ml. Objem 10 ml byl převeden do voltametrické cely a analyzován s použitím metody standardního přídatku. Byly použity tři přídatky standardního roztoku rutinu. Počet opakování měření každého modelového vzorku  $n = 5$ .

#### 4.3.4. *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí*

Mobilní fáze byla připravena rozpuštěním naváženého množství dihydrogenfosforečnanu sodného (pro pH 3 a 5) nebo hydrogenfosforečnanu sodného (pro pH 7) ve vodě. Pro odstranění nerozpuštěných částic byly pufrы zfiltróvány přes 0,2  $\mu\text{m}$  porézní filtr a smíchány s acetonitrilem v požadovaném objemovém poměru. pH mobilní fáze bylo nastaveno na požadovanou hodnotu koncentrovanou kyselinou fosforečnou. Průtoková rychlost byla nastavena na 0,3 ml/min. Potenciál cely byl variován podle potřeby, konkrétní hodnoty jsou uvedeny u jednotlivých experimentů (vs. Pd/H<sub>2</sub>). Potenciál ochranné cely byl nastaven na 750 mV. Citlivost měření byla regulována podle potřeby od 0,5  $\mu\text{A}$  do 20  $\mu\text{A}$ . Referenční UV detekce byla zaznamenávána při vlnové délce 210 nm. Nástřik vzorku byl prováděn přeplněním 4  $\mu\text{l}$  nástřikové smyčky.

Hydrodynamické voltamogramy modelové směsi standardů látek TOL, FES, 5-HMT a vnitřního standardu berberinu o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  byly měřeny postupným zvyšováním potenciálu po 70 mV v rozsahu potenciálů od 700 mV do 1470 mV. Následně byly hydrodynamické voltamogramy vyhodnoceny jako závislosti ploch pík standardů ( $\mu\text{A} \cdot \text{s}$ ) na aplikovaném potenciálu. Odhad meze detekce a stanovitelnosti TOL, FES a 5-HMT byly

určeny experimentálně jako trojnásobek (LOD) nebo desetinásobek (LOQ) šumu slepého pokusu.

#### 4.3.5. *Elektrolýza za konstantního potenciálu*

Elektrolýza byla prováděna u TOL, FES a 5-HMT v různých prostředích při různých hodnotách konstantního potenciálu (*Tabulka 5*, Odd. 5.3). Všechny vzorky byly elektrolyzovány v míchaném roztoku o koncentraci 1 mmol/l (TOL) a 0,5 mmol/l (FES a 5-HMT) v celkovém objemu 1,2 nebo 1,6 ml, dokud proudová odezva neklesla na zbytkovou hodnotu.

#### 4.3.6. *Analýza oxidačních produktů metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií*

Mobilní fázi A tvořil vodný roztok octanu amonného o koncentraci 0,01 mol/l a fázi B acetonitril. Separace probíhala s gradientem: 0-5 min (10–80 % B), 5–6 min (80 % B), 6–7 min (80–10 % B) a 7–10 min (10 % B). Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min, termostat kolony byl nastaven na 25 °C, teplota autosampleru na 10 °C. Objem nastříkovaného vzorku byl 3 µl (TOL) nebo přeplněním nástřikové 20 µl smyčky (FES a 5-HMT).

Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem byla použita za následujících podmínek: napětí sprejovací kapiláry 3 kV (pozitivní mód), teplota zdroje 100 °C, vzorkovací kónus 30 V, desolvatační teplota 150 °C, průtoková rychlost plynu v kónusu 38 l/h a průtoková rychlost desolvatačního plynu 450 l/h. Použitým plynem ve zdroji byl dusík, kolizním plynem argon. Data byla získána průběžným snímáním při nižší kolizní energii 5 eV a při vyšší kolizní energii za použití rampy kolizní energie v rozsahu 15–35 eV nebo 5–15 eV.

#### 4.3.7. *Stanovení rutinu v extraktech z pohanky*

Pro stanovení rutinu v pohance seté byly vyzkoušeny čtyři extrakční postupy: povaření pohanky ve vodě (BWE), klasická Soxhletova extrakce (SE), vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (PSE) a nadkritická fluidní extrakce (SFE). Pro extrakce byly s analytickou přesností naváženy 1 nebo 2 g rozdrčených pohankových semen. Pro extrakci rutinu varem byla rozdrčená pohanková semena vařena po dobu pěti minut v přibližně 50 ml destilované vody. Po vychladnutí byly vzorky centrifugovány po dobu dvaceti minut a následně zfiltrány. Filtr byl promýván destilovanou vodou. Pro SE byl jako rozpouštědlo použit

methanol. Při zahřívání topným hnízdem probíhala extrakce po dobu dvou hodin. Extrakt byl doplněn v odměrné baňce methanolem. PSE extrakce probíhala za těchto podmínek: tlak 150 barů, teplota 100 °C, rozpouštědlo aceton. Byly provedeny dva cykly po deseti minutách statické extrakce. Extrakt byl doplněn v odměrné baňce acetonem. SFE extrakce oxidem uhličitým probíhala za podmínek: teplota extrakční cely  $t_e = 35$  °C, teplota restriktoru  $t_c = 100$  °C, teplota záhytu  $t_t = 30$  °C, tlak 25 MPa, doba analýzy 30 min, rozpouštědlo aceton. Extrakt byl doplněn v odměrné baňce acetonem. Extrakty byly analyzovány voltametriky. Srovnávací HPLC/UV-Vis metoda stanovení rutinu v modelových vzorcích a extraktech pohanky byla převzata z literatury [189].



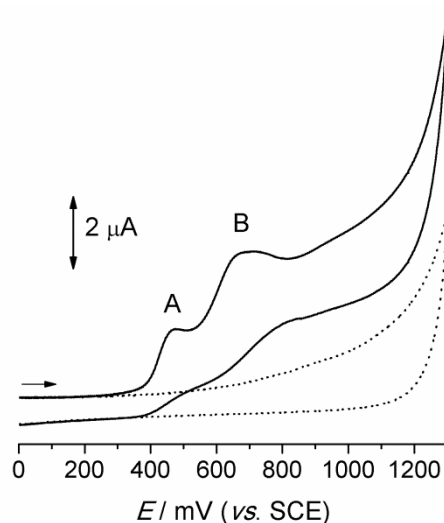
## 5. Výsledky a diskuze

### 5.1. Elektrochemické chování antimuskarinik

V této kapitole je sledováno elektrochemické chování látek tolterodinu, fesoterodinu a 5-hydroxymethyltolterodinu voltametričnými technikami (CV, DPV a SWV). Z cyklických voltamogramů, závislostí proudových odezev a potenciálů na pH, rychlosti scanu a koncentraci je získána představa o mechanismu oxidace těchto antimuskarinik.

#### 5.1.1. Elektrochemické chování tolterodinu

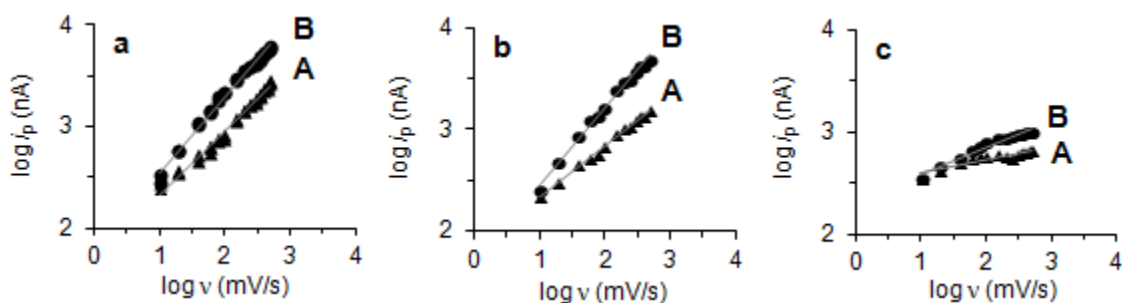
Cyklický voltamogram tolterodinu v prostředí methanolu a B-R pufru pH 7,4 (1:1, v/v, Obr. 5.1) ukazuje dva oxidační signály s potenciály 480 mV (pík A) a 680 mV (pík B). V reverzním katodickém směru polarizace nebyl u TOL pozorován odpovídající redukční pík, což indikuje ireverzibilní děj.



Obr. 5.1. Cyklický voltamogram tolterodinu o koncentraci 0,1 mmol/l (—) a základního elektrolytu  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{B-R}$  pufr pH 7,4 (⋯), rychlost scanu 100 mV/s.

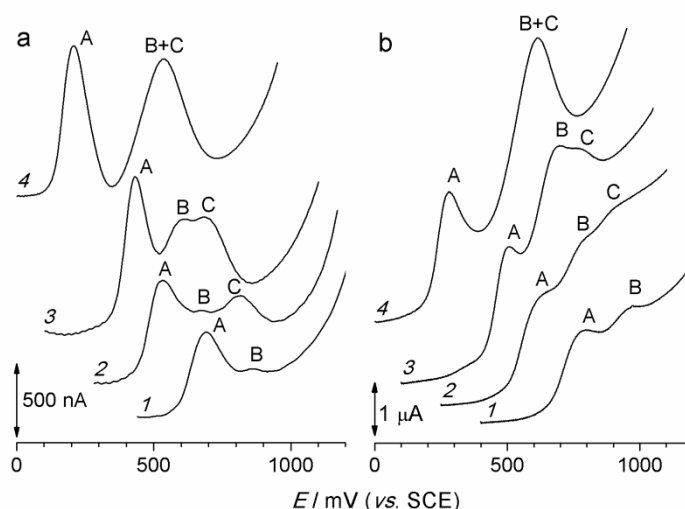
Vliv rychlosti scanu na anodickou odezvu TOL byl sledován v prostředí B-R pufru pH 7,4 bez methanolu (i), s 50 % methanolu (ii) a v nevodném prostředí methanolu s octanem amonným (iii). S rostoucí rychlostí polarizace narůstá výška obou píků (A, B). Závislost  $\log i_p$  na  $\log v$  je lineární se směrnici a jejich směrodatnými odchylkami ( $0,62 \pm 0,02$ ) pro pík A a ( $0,74 \pm 0,01$ ) pro pík B ve vodném prostředí (Obr. 5.2 a), ( $0,50 \pm 0,01$ ) pro pík A a ( $0,75 \pm 0,02$ ) pro pík B v prostředí  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{B-R}$  pufr 1:1 (Obr. 5.2 b) a ( $0,14 \pm 0,02$ ) pro pík A a ( $0,26 \pm 0,02$ ) pro pík B v nevodném prostředí  $\text{CH}_3\text{OH}$  s  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (Obr. 5.2 c).

Směrnice s hodnotou 0,5 odpovídá teoretické hodnotě pro děj kontrolovaný výhradně difúzí. Vyšší hodnoty indikují vliv adsorpce, speciálně přítomnost vodné složky podporuje adsorpci TOL na elektrodový povrch. Směrnice nižší než 0,5 v methanolickém prostředí může být důsledkem určitých kinetických procesů (např. dimerizace) doprovázejících elektrodovou reakci.



Obr. 5.2. Vztah mezi rychlostí scanu CV a anodické proudové odezvy tolterodinu A a B (konc. 0,1 mmol/l) vyjádřen závislostí  $\log i_p - \log v$ . Rychlosti scanu v rozsahu 10 až 500 mV/s v prostředích: B-R pufr pH 7,4 (a), CH<sub>3</sub>OH/B-R pufr pH 7,4 (1:1, v/v, b) a nevodné prostředí CH<sub>3</sub>OH s 0,1M-CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (c).

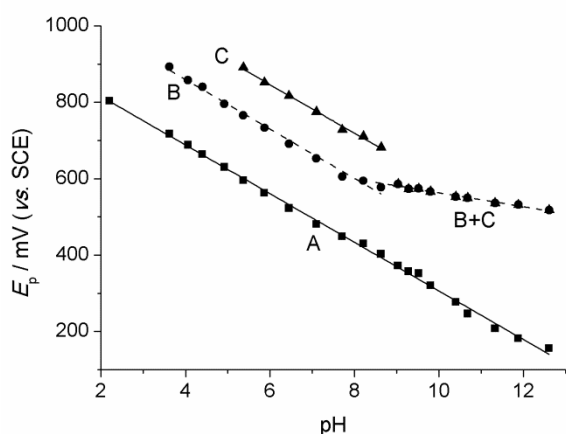
U obou CV píků tolterodinu je pozorován posun potenciálu k pozitivnějším hodnotám se zvyšující se hodnotou rychlosti scanu. Ve vodných prostředích závislost potenciálu  $E_p$  na  $\log v$  je možné proložit přímkou se směrnicí a její směrodatnou odchylkou ( $15 \pm 4$ ) mV/log jednotku pro pík A a ( $60 \pm 4$ ) mV/log jednotku pro pík B. První hodnota odpovídá teoretickým předpokladům posunu potenciálu pro dvouelektronovou reverzibilní elektrodovou reakci následovanou ireverzibilní chemickou reakcí. Druhá hodnota je typická pro jednoelektronovou elektrodovou reakci, kdy redukovaná i oxidovaná forma jsou silně adsorbovány na povrch elektrody [85,190].



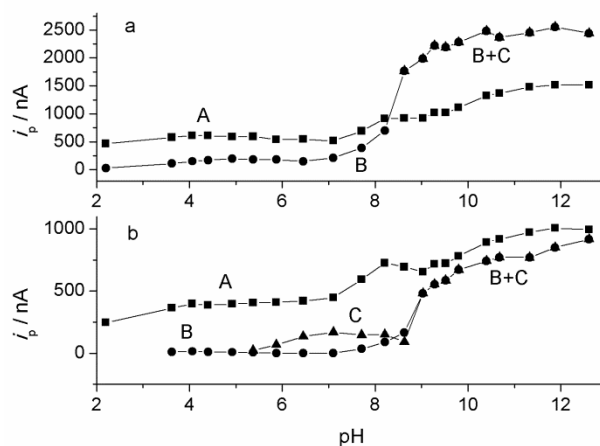
Obr. 5.3. Diferenční pulzní (a) a lineární (b) voltamogramy tolterodinu (0,1 mmol/l) v CH<sub>3</sub>OH/B-R pufr (1:1, v/v), pH 4,1 (1), pH 6,5 (2), pH 8,2 (3), pH 11,3 (4). DPV: rychlost scanu 20 mV/s, pulzní amplituda 0,05 V, šířka pulzu 0,1 s. LSV: rychlost scanu 100 mV/s.

Oxidace tolterodinu je závislá rovněž na pH (Obr. 5.3). V kyselém prostředí do pH 5,5 dominuje pík A, pro pík B je pozorována jen velmi malá odezva (Obr. 5.3, křivka 1). Pro  $\text{pH} \geq 6$  se při pozitivnějším potenciálu objevuje třetí signál C (Obr. 5.3, křivka 2). Intenzita píků B a C se zvyšuje s rostoucím pH (Obr. 5.3, křivka 3) a při  $\text{pH} \geq 9$  se tyto signály překrývají za vzniku jednoho výrazného píku označeného B+C (Obr. 5.3, křivka 4).

Ze závislosti potenciálu na pH (Obr. 5.4) je zřejmý posun potenciálu všech tří píků (A, B a C) k méně pozitivním hodnotám při zvyšování pH. Směrnice regresních přímek  $E_p - \text{pH}$  závislostí a jejich směrodatné odchylky jsou  $(-63,4 \pm 0,5) \text{ mV pH}^{-1}$  pro pík A,  $(-62,6 \pm 1,4) \text{ mV pH}^{-1}$  pro pík C,  $(-65,0 \pm 2,5) \text{ mV pH}^{-1}$  pro pík B v rozsahu pH 3,2–8,0 a  $(-16,3 \pm 1,0) \text{ mV pH}^{-1}$  v rozsahu pH 8,6–12,6. Směrnice blíží se teoretické hodnotě  $-59 \text{ mV pH}^{-1}$  napovídá, že první oxidační stupeň a další dva oxidační procesy do mírně alkalického prostředí zahrnují stejný počet protonů a elektronů. Zlomový bod závislosti  $\text{pH} = 8,5$  by mohl odpovídat disociační konstantě některého oxidačního produktu tolterodinu ( $\text{p}K_a = 8,5$ ). Ze závislosti  $i_p - \text{pH}$  je patrný výraznější nárůst proudové odezvy tolterodinu při  $\text{pH} > 8$  (Obr. 5.5). Především produkt/y tvořené při potenciálu píku A poskytující signál při potenciálech píku B a C jsou snadněji oxidovány v alkalickém prostředí.



Obr. 5.4. Závislost potenciálu DPV píku tolterodinu (0,1 mmol/l) na pH pro anodické signály A, B, C a spojený pík B+C.



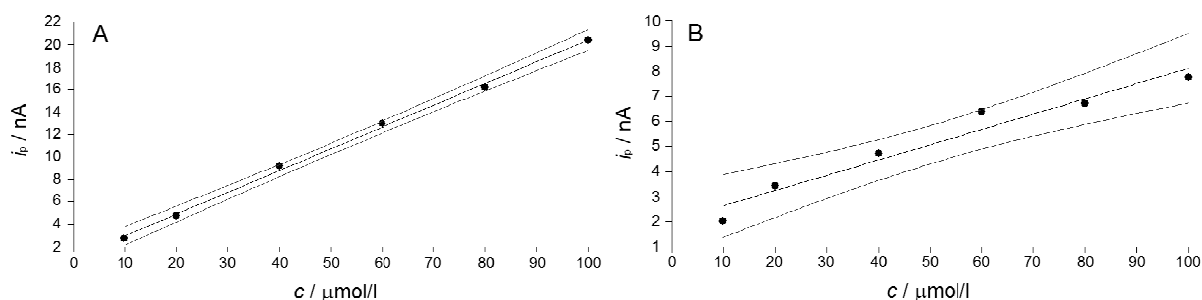
Obr. 5.5. Závislost proudové odezvy tolterodinu (0,1 mmol/l) na pH. Píky A (■), B (●) a C (▲) měřené metodami CV (a) s rychlostí scenu 100 mV/s a DPV (b) s rychlostí scenu 20 mV/s, pulzní amplitudou 0,05 V a šířkou pulzu 0,1 s.

Kalibrační závislost anodických odezev tolterodinu (píku A a B) byly měřeny cyklickou voltametrií v rozsahu koncentrací 10–100  $\mu\text{mol/l}$  v prostředí  $\text{CH}_3\text{OH/B-R}$  pufru pH 7,4. Závislosti proudových odezev TOL na jeho koncentraci byly v měřeném rozsahu lineární (Obr. 5.6). Parametry regresních kalibračních přímek, LOD a LOQ jsou uvedeny v *Tabulce 1*.

Tabulka 1 Parametry regresních kalibračních přímek tolterodinu

pík	LOD ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	$a \pm s_a$ ( $\text{nA l } \mu\text{mol}^{-1}$ )	$b \pm s_b$ (nA)	$R^2$
A	9,6	13,9	$0,194 \pm 0,005$	$1,03 \pm 0,27$	0,9978
B	40,0	53,7	$0,061 \pm 0,007$	$2,03 \pm 0,41$	0,9524

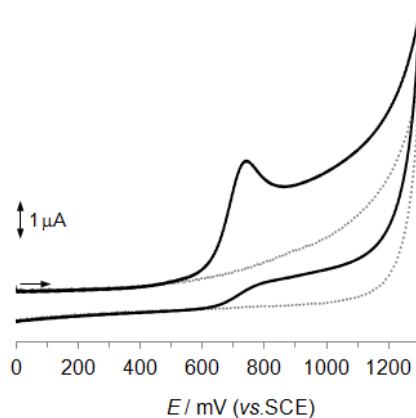
LOD – odhad meze detekce, LOQ – odhad meze stanovitelnosti,  $a$  – směrnice kalibrační závislosti,  $b$  – úsek kalibrační přímky,  $R^2$  – koeficient determinace,  $s$  – směrodatná odchylka



Obr. 5.6. Závislost proudové anodické odezvy píku A a B tolterodinu na jeho koncentraci. Měřeno CV s rychlostí scanu 100 mV/s.

### 5.1.2. Elektrochemické chování fesoterodinu

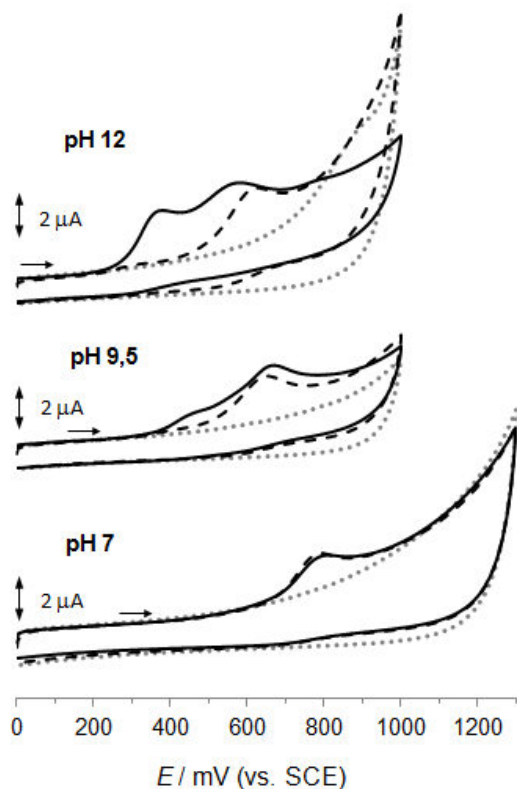
Cyklický voltamogram fesoterodinu v prostředí methanolu a B-R pufru o pH 7,4 (1:1, v/v; Obr. 5.7) poskytuje jeden anodický oxidační signál při potenciálu 740 mV. V opačném, katodickém směru není pozorována odpovídající odezva, což značí ireverzibilní děj.



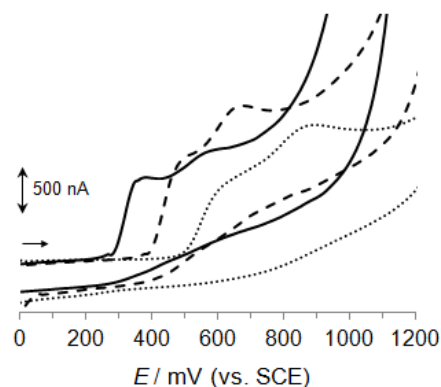
Obr. 5.7. Cyklický voltamogram fesoterodinu o koncentraci 0,1 mmol/l (—) a základního elektrolytu  $\text{CH}_3\text{OH/B-R}$  pufr pH 7,4 (⋯), rychlost scanu 100 mV/s.

Byla studována stabilita fesoterodinu v neutrálních a alkalických roztocích (pH 7; 9,5 a 12). Byly zaznamenány cyklické voltamogramy základního elektrolytu ( $\text{CH}_3\text{OH/B-R}$  pufr o daném pH, 1:1, v/v), směsi standardu FES a základního elektrolytu (ZE) ihned po smíchání (čas 0 min) a poté v prodlužujících se časových intervalech až do několika hodin po smíchání směsi. V prostředí o pH 7 v čase 0 min poskytuje FES jeden oxidační signál s maximem při 800 mV. Po 180 min (Obr. 5.8), a dokonce i po 24 h stání směsi byl pozorován opět jediný

anodický pík. S časem však docházelo ke snižování signálu FES v důsledku jeho adsorpce (Obr. 5.10). Adsorpce byla potvrzena následujícím experimentem. Vyleštěná elektroda byla ponechána v roztoku FES po dobu 5 min bez elektrolýzy, poté důkladně opláchnuta destilovanou vodou a bez leštění vložena do roztoku čistého ZE, ve kterém byl pořízen záznam CV. Na voltamogramu byl pozorován pík FES.

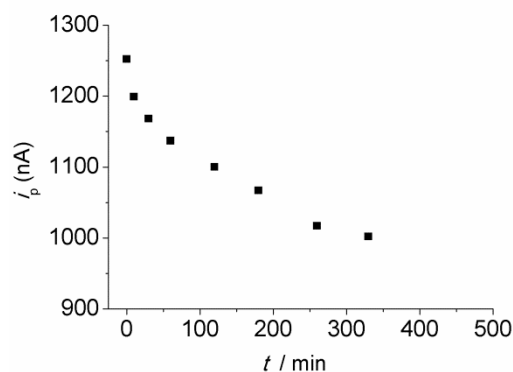


Obr. 5.8. Cyklický voltamogram fesoterodinu o koncentraci 0,1 mmol/l v prostředí o různém pH: 7, 9,5 a 12. CV základního elektrolytu: methanol/B-R pufr (1:1, v/v, .....), směsi ihned po smíchání FES se základním elektrolytem (- - -) a po 180 min stání směsi (—), rychlost scanu 100 mV/s.

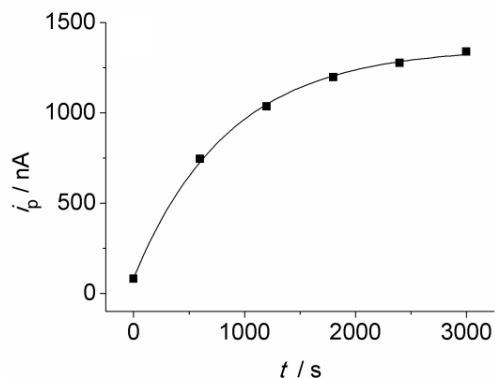


Obr. 5.9. Cyklický voltamogram 5-HMT o koncentraci 0,1 mmol/l v prostředí  $\text{CH}_3\text{OH/B-R}$  pufr (1:1, v/v) pH 7 (.....), pH 9,5 (- - -) a pH 12 (—), rychlost scanu 100 mV/s.

Při pH 9,5 se už po deseti minutách objevuje kromě píku fesoterodinu ( $E_p = 660 \text{ mV}$ ) také pík s potenciálem  $E_p = 480 \text{ mV}$  (Obr. 5.8), jehož intenzita narůstá s dobou stání směsi k limitní hodnotě proudu píku 80 nA. V prostředí o pH 12 se kromě píku fesoterodinu při 570 mV objevuje rovněž druhý pík při 370 mV (Obr. 5.8), jehož signál s časem stání směsi narůstá k limitní hodnotě proudu píku 1,3  $\mu\text{A}$  (Obr. 5.11). Tento pík předcházející signál FES koresponduje s prvním oxidačním signálem 5-HMT (480 mV pro pH 9,5 a 370 mV pro pH 12; Obr. 5.9). V alkalickém prostředí evidentně dochází k hydrolyze FES na 5-HMT. V neutrálním prostředí dostáváme první oxidační signál 5-HMT při 620 mV (Obr. 5.9), tento pík u FES nebyl pozorován ani po 1080 minutách stání směsi. Z výše uvedených experimentů vyplývá, že v neutrálním prostředí k hydrolyze FES na 5-HMT nedochází.



Obr. 5.10. Závislost anodické proudové odezvy fesoterodinu na čase znázorňující úbytek signálu při stání směsi FES a ZE ( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{BR}$ -pufr pH 7, 1:1, v/v, koncentrace FES ve směsi 0,1 mmol/l). Měřeno CV při rychlosti scanu 100 mV/s.

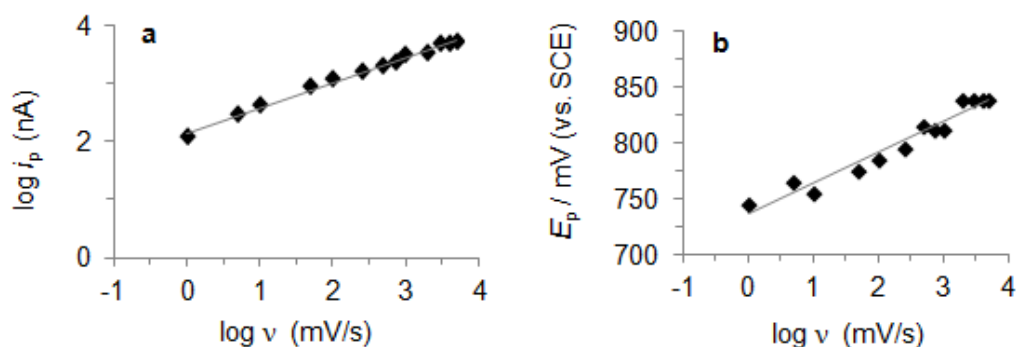


Obr. 5.11. Závislost anodické odezvy na čase pro 5-HMT vznikající hydrolyzou v roztoku FES o pH = 12. Měřeno CV při rychlosti scanu 100 mV/s.

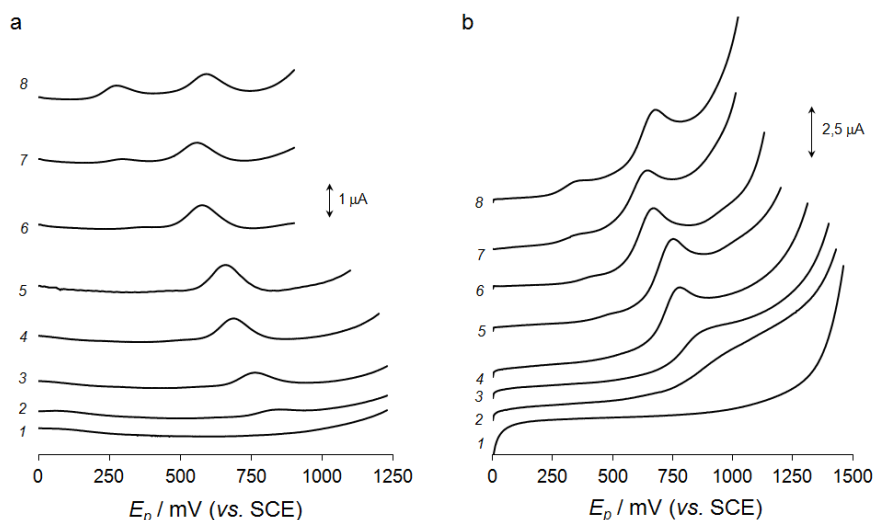
Nárůst proudové odezvy 5-HMT s časem umožňuje sledovat kinetiku alkalické hydrolyzy esterové vazby FES. Obecně je hydrolyza esterů bimolekulární reakcí 2. řádu, jejíž rychlost závisí na koncentraci obou reaktantů [191]. Lze však předpokládat, že v roztoku o pH 12, v němž je koncentrace hydroxidových iontů ve stonásobném nadbytku proti koncentraci FES ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l), zůstane při reakci koncentrace hydroxidu prakticky konstantní. Pak ji lze zahrnout do rychlostní konstanty a převést tak reakci 2. řádu na pseudomonomolekulární reakci 1. řádu [191]. Za těchto předpokladů byla z nárůstu proudové odezvy 5-HMT v roztoku o pH 12 (Obr. 5.11) vypočítána rychlostní konstanta hydrolyzy FES. K výpočtu byl použit vztah pro reakční kinetiku 1. řádu  $y = a(1 - e^{-kt}) + c$ , kde  $y$  je proud píku produktu v čase  $t$ ,  $a$  je maximální limitní hodnota proudu píku produktu,  $k_r$  je rychlostní konstanta a  $c$  je proud píku produktu v čase 0 s [192]. Rychlostní konstanta hydrolyzy má hodnotu  $(k_r \pm s) = (1,17 \pm 0,05) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  pro  $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ , poločas hydrolyzy pak odpovídá hodnotě  $t_{1/2} = 10 \text{ min}$ .

Vliv rychlosti scanu na anodickou odezvu FES byl pozorován v prostředí  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{B-R}$  pufr pH 7,5 (1:1, v/v). S rostoucí rychlostí scanu v rozsahu od 1 do 5000 mV/s narůstá výška anodického signálu FES. Závislost  $\log i_p$  na  $\log v$  je lineární (Obr. 5.12 a) se směrnici a její směrodatnou odchylkou  $(0,43 \pm 0,01)$ , což naznačuje děj řízený difúzí. Se zvyšující se rychlostí scanu je pozorován posun píku FES k pozitivnějším hodnotám potenciálu. Závislost  $E_p - \log v$  (Obr. 5.12 b) je možné proložit přímkou. Hodnota směrnice a její směrodatná odchylka  $(27,7 \pm 1,9) \text{ mV}/\log$  jednotku odpovídá teoretickým předpokladům posunu potenciálu pro jednoelektronovou reverzibilní elektrodovou reakci následovanou ireverzibilní

chemickou reakcí nebo ireverzibilní dvouelektronovou reakcí s koeficientem přenosu náboje  $\alpha = 0,54$  [85].

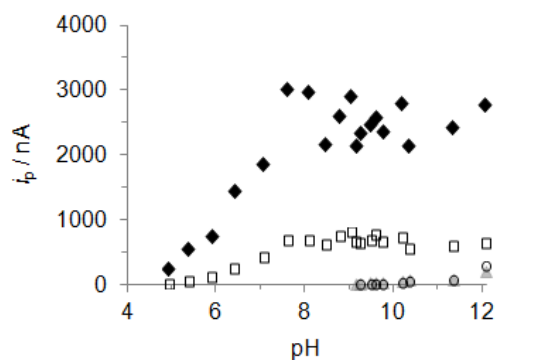


Obr. 5.12. Závislosti potenciálu (a) a logaritmu proudu (b) CV píku fesoterodinu na logaritmu rychlosti polarizace elektrody (1–5000 mV/s). Prostředí methanol/B-R pufr pH 7,5 (1:1, v/v).

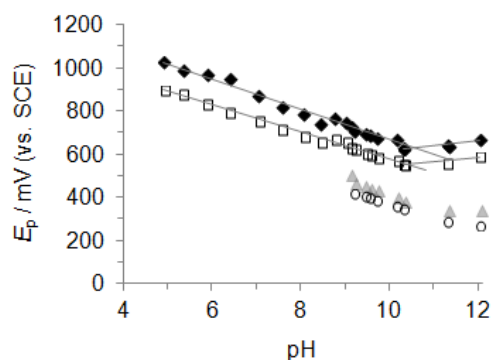


Obr. 5.13. Diferenční pulzní (a) a lineární (b) voltamogramy fesoterodinu (0,1 mmol/l) v prostředí  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{B-R}$  pufr (1:1, v/v) o pH 6 (2), 7 (3), 8 (4), 9 (5), 10 (6), 11 (7) a 12 (8). Linie základního elektrolytu pH 6 (1). DPV: rychlost scanu 20 mV/s, pulzní amplituda 0,05 V, šířka pulzu 0,1 s. LSV: rychlost scanu 100 mV/s.

Oxidace fesoterodinu je závislá na pH (Obr. 5.13). V kyselém prostředí  $\text{pH} < 5$  a koncentraci FES 0,1 mmol/l nebyla pozorována žádná odezva, k oxidaci FES zde dochází jen obtížně. Oxidační pík FES se začíná objevovat až při pH 5. Proudová odezva tohoto píku roste s alkalitou až do hodnoty pH 7,5 (Obr. 5.14). Při  $\text{pH} > 7,5$  nemá proudová odezva FES žádný specifický trend a její výška se pohybuje v rozmezí 2,2–2,8  $\mu\text{A}$  pro CV a 0,6–0,8  $\mu\text{A}$  pro DPV. Při  $\text{pH} \geq 9$  se ve voltametričtém záznamu objevuje také pík předcházející odezvu FES (Obr. 5.13, křivka 6, 7 a 8). V alkalickém prostředí dochází k hydrolyze FES na 5-HMT (viz výše), tento pík tedy odpovídá prvnímu oxidačnímu píku 5-HMT a se zvyšováním alkality prostředí narůstá jeho odezva (Obr. 5.14).



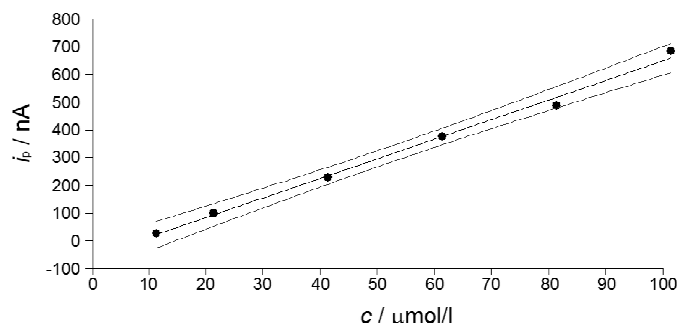
Obr. 5.14. Závislost proudové anodické odezvy fesoterodinu (0,1 mmol/l) CV (♦), DPV (□) a vznikajícího 5-HMT CV (▲), DPV (○) na pH. Rychlost scanu 100 mV/s (CV) a 20 mV/s, pulzní amplituda 50 mV a šířka pulzu 0,1 s (DPV).



Obr. 5.15. Závislost potenciálu anodické odezvy na pH pro fesoterodin (0,1 mmol/l) CV (♦) a DPV (□) a hydrolyzou FES vznikající 5-HMT CV (▲) a DPV (○). Rychlost scanu 100 mV/s (CV) a 20 mV/s, pulzní amplituda 50 mV a šířka pulzu 0,1 s (DPV).

Ze závislosti potenciálu anodické odezvy FES na pH (Obr. 5.15) je zřejmý posun píku FES k nižším kladným hodnotám do pH 10,3. Závislostí potenciálu  $E_p$  na pH v rozsahu pH 5–10,3 je možno proložit přímkou se směrnicí a její směrodatnou odchylkou  $(-62,9 \pm 1,6) \text{ mV pH}^{-1}$  pro DPV a  $(-69,2 \pm 3,1) \text{ mV pH}^{-1}$  pro CV. Směrnice blízkí se teoretické hodnotě  $-59 \text{ mV pH}^{-1}$  napovídá, že oxidační děj FES zahrnuje stejný počet protonů a elektronů. V alkaličtějším roztocích potenciál píku FES prakticky nezávisí na aciditě roztoku. Průsečík dvou lineárních úseků závislosti  $E_p - \text{pH}$  při pH 10,5 odpovídá disociační konstantě fesoterodinu  $\text{p}K_a = 10,31$  [116].

Kalibrační závislost anodické odezvy fesoterodinu byla měřena diferenční pulzní voltametrií v rozsahu koncentrací 10–100  $\mu\text{mol/l}$  v prostředí  $\text{CH}_3\text{OH/B-R}$  pufr pH 7,5 (1:1, v/v). Závislost proudové odezvy FES na jeho koncentraci byla v měřeném rozsahu lineární (Obr. 5.16). Parametry regresní kalibrační přímky, LOD a LOQ jsou uvedeny v *Tabulce 2*.



Obr. 5.16. Závislost proudové anodické odezvy fesoterodinu na jeho koncentraci. Měřeno DPV s rychlostí scanu 20 mV/s, pulzní amplitudou 50 mV a šířkou pulzu 0,1 s.



Tabulka 2 Parametry kalibrační závislosti fesoterodinu

LOD ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	$a \pm s_a$ (nA l $\mu\text{mol}^{-1}$ )	$b \pm s_b$ (nA)	$R^2$
14,8	21,0	$7,08 \pm 0,26$	$-48,8 \pm 15,7$	0,9947

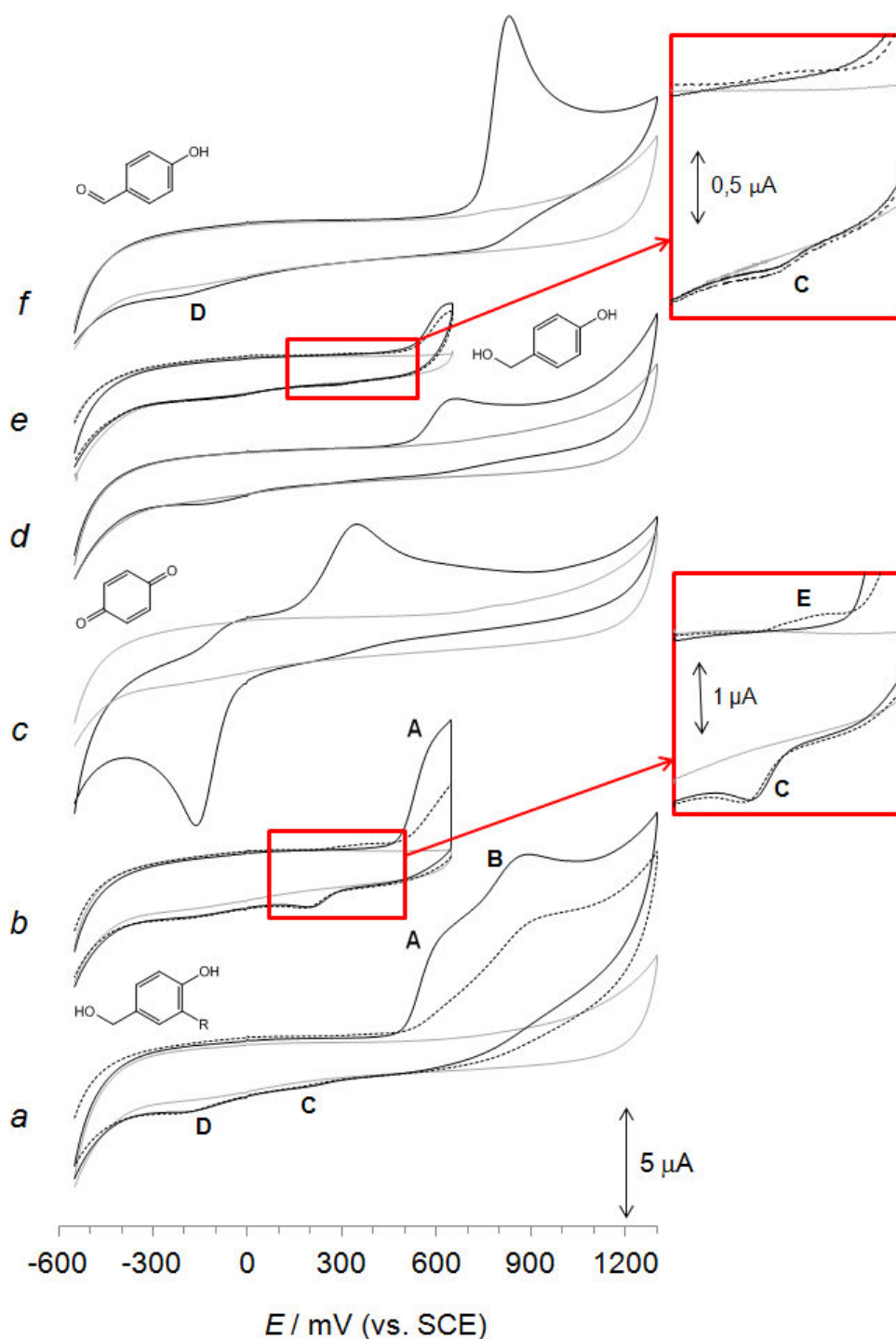
LOD – odhad meze detekce, LOQ – odhad meze stanovitelnosti,  $a$  – směrnice kalibrační závislosti,  $b$  – úsek kalibrační přímky,  $R^2$  – koeficient determinace,  $s$  – směrodatná odchylka

### 5.1.3. Elektrochemické chování 5-hydroxymethyltolterodinu

Cyklický voltamogram 5-hydroxymethyltolterodinu (Obr. 5.17 a) v prostředí methanolu a B-R pufru pH 7,5 (1:1, v/v) ukazuje dva anodické oxidační signály s potenciály 600 mV (pík A) a 860 mV (pík B). V reverzním katodickém záznamu se objevují rovněž dva signály s potenciály 220 mV (pík C) a -170 mV (pík D). Volbou přepínacího potenciálu těsně za maximem píku A (670 mV, Obr. 5.17 b) podpořené akumulací při 670 mV, dostáváme v katodickém směru intenzivnější pík C a v následujícím anodickém scanu pík E při potenciálu 370 mV (Obr. 5.17 b). Znamená to, že při potenciálu píku A vzniká elektroaktivní produkt projevující se kvazireverzibilní dvojicí píků C a E ( $E_{p,E} - E_{p,C} = 370 - 220 = 150$  mV).

Z analogického chování samotného fenolu, které je popsáno v literatuře [88], lze usoudit, že při potenciálu píku A dochází k jedoelektronové oxidaci 5-HMT za vzniku fenoxo radikálu, který následně může tvořit C-C dimery (bifenoly) podléhající další oxidaci na příslušný bifenoquinon (Schéma 2, str. 20). Redukce bifenoquinonu na bifenol se v katodickém směru polarizace projeví píkem C. Redoxní reakce dimerních chinonů jsou reverzibilní a ve druhém anodickém scanu tak dostáváme signál E (Obr. 5.17 b), při kterém dochází k oxidaci bifenolu na bifenoquinon.

Pík D, který se objevuje na katodické větvi cyklického voltamogramu 5-HMT, leží při stejném potenciálu (-170 mV) jako redukční pík *p*-benzochinonu (Obr. 5.17 c). Intenzita tohoto píku je větší při zvoleném přepínacím potenciálu pozitivnějším, než je potenciál píku B. Je tedy možné, že ve druhém stupni oxidace 5-HMT (pík B), je oxidován příslušný fenoxo radikál na fenoxoniový kation. Ten může reagovat s vodou za vzniku odpovídajícího diolu, který se dále oxiduje na chinon. Redukce tohoto chinonu se projevuje píkem D. Podobná tvorba fenoxoniového kationtu a jeho další reakce až na chinon jsou dobře popsány u nesubstituovaného fenolu (Schéma 2, str. 20) [88].

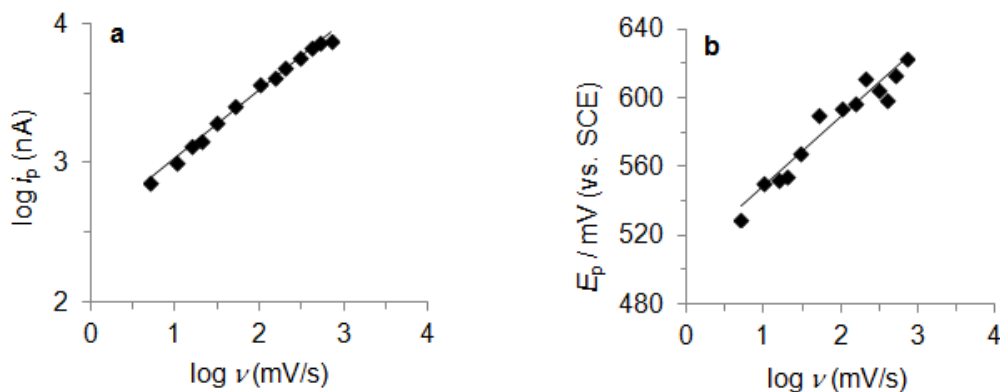


Obr. 5.17. Cyklický voltamogram 5-HMT s přepínacím potenciálem 1,3 V (a) a 650 mV s akumulací 30 s při 650 mV (b), *p*-benzochinonu (c) 4-(hydroxymethyl)fenolu s přepínacím potenciálem 1,3 V (d) a 650 mV (e) a 4-hydroxybenzaldehydu (f). Koncentrace látek 0,5 mmol/l, základní elektrolyt: CH<sub>3</sub>OH/B-R pufr pH 7,5 (1:1, v/v, šedá), 1. cyklus (černá), 2. cyklus (tečkovaná), rychlost scanu 50 mV/s.

Je pravděpodobné, že současně s tvorbou fenoxyl radikálu dochází v prvním oxidačním kroku 5-HMT k oxidativní dehydrogenaci 5-hydroxymethylové skupiny na aldehydickou skupinu za vzniku 5-formyl derivátu TOL. Podobné chování je pozorováno u standardu 4-(hydroxymethyl)fenolu (Obr. 5.17 d). Na tomto voltamogramu jsou také pozorovatelné dva

redukční píky odpovídající nejspíše stejnému ději, jako u píků C a D 5-HMT, tj. redukcí bifenochinonu a chinonu. Při nižším přepínacím potenciálu je pík C intenzivnější (Obr. 5.17 e), naopak pík D má větší intenzitu při vyšším přepínacím potenciálu, podobně jako u 5-HMT. V literatuře je popsáno podobné chování benzylalkoholu, který je elektrochemicky oxidován na benzaldehyd [193] nebo oxidace *p*-kresolu přes 4-hydroxymethylfenol až konečný produkt *p*-hydroxybenzaldehyd katalyzovaná *p*-kresolmethylhydroxylosou reaktivovanou elektrochemicky in situ [194].

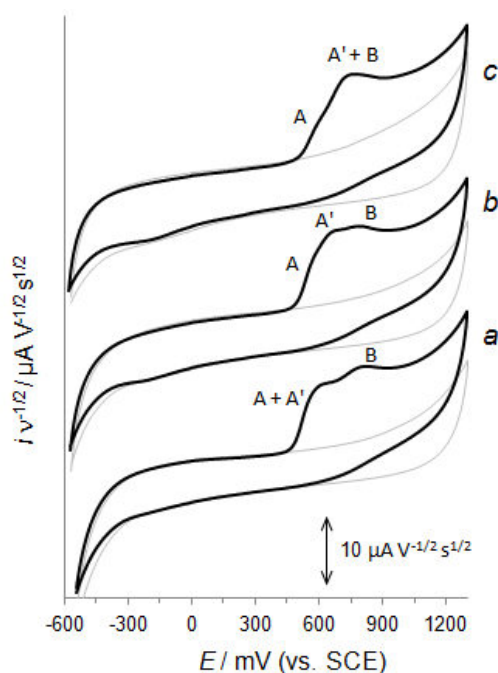
V dalším oxidačním kroku, který se projevuje píkem B lze předpokládat oxidaci 5-formyl derivátu TOL, což potvrzuje shoda potenciálu píku B s oxidačním signálem píku standardu 4-hydroxybenzaldehydu (Obr. 5.17 f). Redukční pík na cyklickém voltamogramu při potenciálu kolem -200 mV, analogický k píku D na voltamogramu 5-HMT, odpovídá s velkou pravděpodobností redukcí příslušného chinonu. Z literatury [195] je známo, že redukce aldehydické skupiny probíhá až při mnohem nižších potenciálech, například formaldehyd se redukuje při  $E_{1/2} = -1,46$  V, benzaldehyd při  $E_{1/2} = -1,50$  V nebo nitrobenzaldehyd při  $E_{1/2} = -0,80$  V (všechny v prostředí o pH = 8). Můžeme očekávat, že na uhlíkové elektrodě v použitém potenciálovém rozsahu za daných podmínek nebude redukce aldehydické skupiny probíhat.



Obr. 5.18. Závislost proudové odezvy (a) a potenciálu (b) píku A 5-HMT (0,1 mmol/l) na rychlosti scanu. Rozsah rychlostí scanu od 5 až 700 mV/s, prostředí methanol/B-R pufr pH 7,5 (1:1, v/v).

Vliv rychlosti scanu v rozsahu 5 – 700 mV/s na proudovou odezvu píku A 5-HMT a na jeho potenciál byl pozorován v prostředí CH<sub>3</sub>OH/B-R pufr pH 7,5 (1:1, v/v). S rostoucí rychlostí scanu od 5 mV/s narůstá výška píku A. Závislost  $\log i_p$  na  $\log v$  je lineární (Obr. 5.18 a) se směrnici a směrodatnou odchylkou ( $0,49 \pm 0,01$ ), což naznačuje děj řízený difúzí. Se zvyšující se rychlostí scanu je pozorován posun píku A 5-HMT k pozitivnějším hodnotám potenciálu. Závislost  $E_p - \log v$  (Obr. 5.18 b) lze proložit přímkou se směrnici a směrodatnou odchylkou ( $40,1 \pm 3,2$ ) mV/log jednotku. Pro ireverzibilní elektrodovou reakci

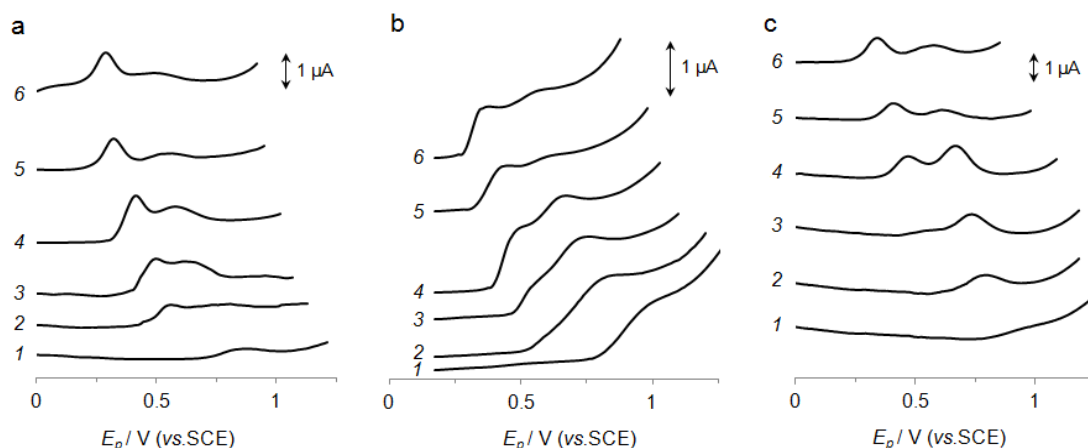
z teorie plyne posun potenciálu píku  $30/\alpha n$  (mV) při 25 °C při desetinásobném zvýšení rychlosti scanu. Za předpokladu, že  $n = 1$ , lze pro směrnici 40 mV vypočítat koeficient přenosu náboje  $\alpha = 0,75$ .



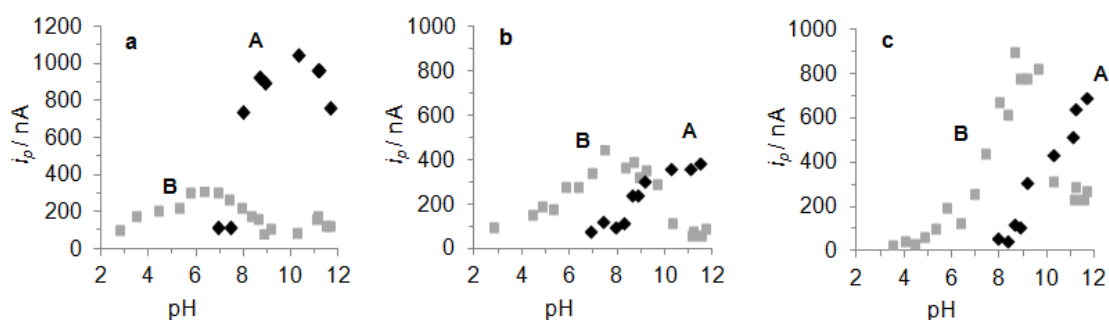
Obr. 5.19. Normované cyklické voltamogramy pro 5-HMT o koncentraci 0,1 mmol/l (černá) při rychlosti scanu 5 mV/s (a), 30 mV/s (b) a 150 mV/s (c). Měřeno v roztoku CH<sub>3</sub>OH/B-R pufr pH 7,5 (1:1, v/v, šedá).

Cyklické voltamogramy 5-HMT ukazují při nižších rychlostech scanu dva oxidační píky (Obr. 5.19 a). Při zvyšování rychlosti scanu můžeme pozorovat tvorbu dalšího píku nepříliš dobře rozlišitelného (Obr. 5.19 b). Při rychlosti vyšší než 150 mV dochází k překryvu těchto signálů (Obr. 5.19 c). Oxidace 5-HMT je složitý proces zahrnující několik postupných dějů, při kterých vznikají elektroaktivní produkty s velmi blízkými redox potenciály. Je tedy obtížné oxidační signály těchto látek přiřadit k dílčím reakcím.

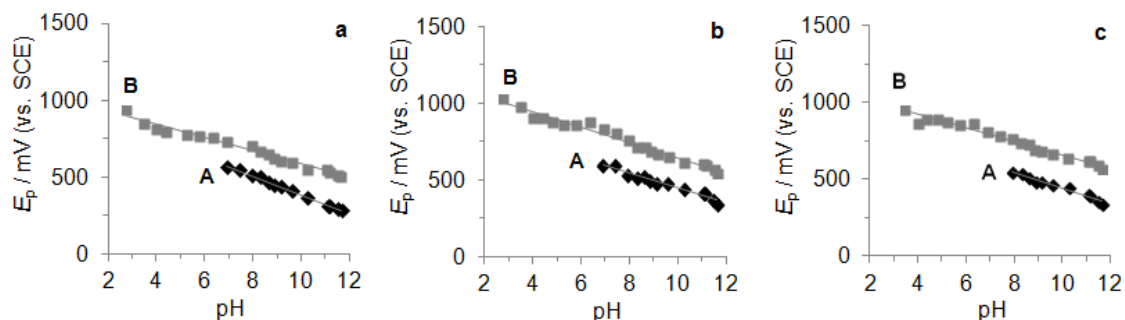
Oxidace 5-hydroxymethyltolterodinu je silně závislá na pH (Obr. 5.20). Oxidační signál píku A se začíná objevovat až v mírně kyselém prostředí. Se zvyšováním pH elektrolytu se jeho odezva zvyšuje a v silně alkalickém prostředí je nejintenzivnější (Obr. 5.21). Odezva oxidačního píku B je zaznamenatelná v širším rozsahu pH 2,75–11,64. Od pH 2,75 jeho odezva se zvyšováním pH roste, svého maxima dosahuje při pH 8 a pro pH > 8 intenzita klesá (Obr. 5.21).



Obr. 5.20. Diferenční pulzní (a), lineární (b) a square wave (c) voltamogramy 5-HMT (0,1 mmol/l) v prostředí CH<sub>3</sub>OH/B-R pufr (1:1, v/v) pH 3,5 (1), pH 6,5 (2), pH 7,5 (3), pH 9,5 (4), pH 11 (5) a pH 12 (6). DPV (a): rychlost scanu 20 mV/s, pulzní amplituda 0,05 V, šířka pulzu 0,1 s. CV (b): rychlost scanu 100 mV/s. SWV (c): rychlost scanu 125 mV/s, amplituda 0,02 V, doba trvání pulzu 40 ms, frekvence 25 Hz.



Obr. 5.21. Závislost proudové anodické odezvy A (♦) a B (■) 5-HMT (0,1 mmol/l) na pH. DPV (a): rychlost scanu 20 mV/s, pulzní amplituda 0,05 V, šířka pulzu 0,1 s. CV (b): rychlost scanu 100 mV/s. SWV (c): rychlost scanu 125 mV/s, amplituda 0,02 V, doba trvání pulzu 40 ms, frekvence 25 Hz.



Obr. 5.22. Závislost potenciálu anodické odezvy A (♦) a B (■) na pH pro 5-HMT (0,1 mmol/l). DPV (a): rychlost scanu 20 mV/s, pulzní amplituda 0,05 V, šířka pulzu 0,1 s. CV (b): rychlost scanu 100 mV/s. SWV (c): rychlost scanu 125 mV/s, amplituda 0,02 V, doba trvání pulzu 40 ms, frekvence 25 Hz.

Ze závislosti potenciálu anodických odezev 5-HMT na pH je evidentní posun všech píků k nižším hodnotám potenciálu s rostoucím pH (Obr. 5.22). Závislostmi  $E_p$  – pH pro tři voltametrické techniky lze proložit přímkou se směrnici v rozmezí  $-49$  až  $-62$  mV pH<sup>-1</sup> pro pík A,  $-43$  až  $-50$  mV pH<sup>-1</sup> pro pík B. Směrnice blízké se teoretické hodnotě  $-59$  mV pH<sup>-1</sup> napovídá, že první a druhý oxidační stupeň zahrnují stejný počet protonů a elektronů. Nižší hodnoty směrnice jsou v tomto případě způsobeny ireverzibilitou elektrodového děje.

## 5.2. Separace antimuskarinik vysokoučinnou kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí

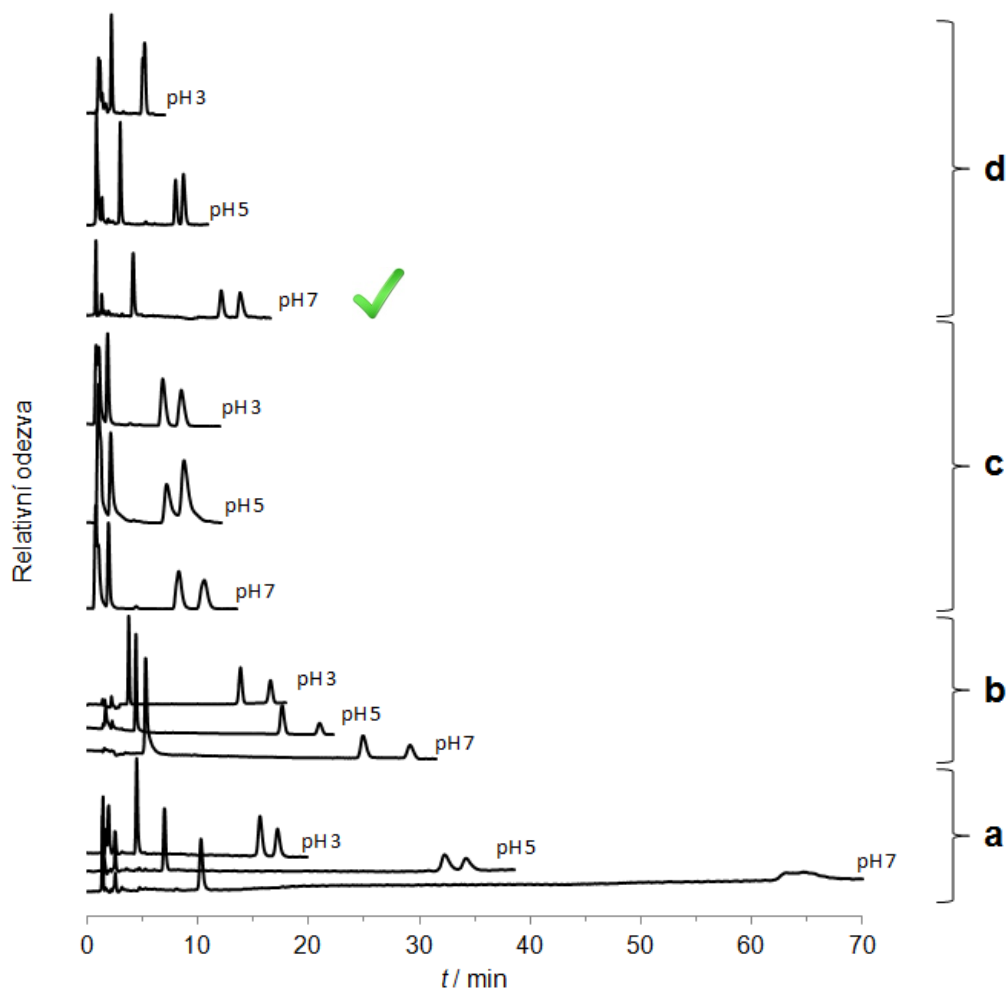
Oxidace TOL, FES a 5-HMT byla analyticky využita při elektrochemické detekci po separaci těchto látek vysokoučinnou kapalinovou chromatografií. Pro analýzu léčiv a jejich metabolitů ve složitých matricích, např. tělních tekutinách, je separace nezbytným krokem.

### 5.2.1. Chromatografická separace

Separace studovaných látek byla testována na čtyřech různých kolonách: Ascentis<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (3 μm, 100 × 2,1 mm), Nucleodur<sup>®</sup> C<sub>8</sub> Gravity (5 μm, 250 × 2 mm), Nucleodur<sup>®</sup> PFP (5 μm, 250 × 2 mm) a Nucleodur<sup>®</sup> CN-RP (3 μm, 125 × 2 mm, Obr. 5.23). Látky byly z kolon vymývány v tomto elučním pořadí 5-HMT, TOL a FES. Pouze u CN-kolony došlo k výměně elučního pořadí mezi TOL a FES.

U elektrochemické detekce je nutné zajistit vodivost mobilní fáze. Za tímto účelem byl použit fosfátový pufr. Jeho vyšší koncentrace (0,1 mol/l) způsobovala prodloužení retenčních časů, oproti koncentraci 0,05 mol/l, o 0,5 min pro 5-HMT, 4,4 min pro TOL a 6,5 min pro FES s mrtvým časem 0,84 min (kolona Ascentis<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, mobilní fáze acetonitril a fosfátový pufr o koncentraci 0,1 nebo 0,05 mol/l v poměru 30:70, v/v). Proto byl zvolen kompromis mezi délkou analýzy a zajištěním dostatečné vodivosti mobilní fáze použitím koncentrace fosfátového pufru 0,05 mol/l. Pro efektivní vymývání látek z kolony je nezbytné mobilní fázi doplnit o organickou složku, v tomto případě byl použit acetonitril. Separace studovaných látek je velmi citlivá na obsah acetonitrilu, který při vyšším obsahu (≥ 35 %) způsoboval překryv píků FES a TOL. Naopak nižší obsah acetonitrilu (≤ 25 %) zapříčinil nadbytečné prodloužení doby analýzy. Obě složky mobilní fáze acetonitril a fosfátový pufr (0,05 mol/l) byly pro izokratický mód smíchány v poměru 30:70 (v/v).

Na separaci studovaných látek mělo významný vliv pH mobilní fáze. Chromatografické kolony jsou omezeny oblastí použitelnosti pH. Čtyři testované kolony se v rozsahu použitelnosti z hlediska pH značně lišily: Nucleodur<sup>®</sup> C<sub>8</sub> Gravity (pH 1–11), Nucleodur<sup>®</sup> PFP (pH 1–9), Nucleodur<sup>®</sup> CN-RP (pH 1–8) a Ascentis<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (pH 2–8). S ohledem na uvedené hodnoty pH u jednotlivých kolon a pro zamezení zatěžování kolon, byly zvoleny testovací hodnoty pH mobilní fáze na pH 3, 5 a 7 (Obr. 5.23).



Obr. 5.23. Chromatogramy tří antimuskarinik separovaných na čtyřech různých kolonách s mobilní fází CH<sub>3</sub>CN/fosfátový pufr o koncentraci 0,05 mol/l (30:70, v/v) o třech různých pH (3, 5 a 7). Látky vycházely v elučním pořadí 5-HMT, TOL a FES z kolony Nucleodur® PFP (a), Nucleodur® C<sub>8</sub> Gravity (b) a Ascentis® C<sub>18</sub> (c). Pro kolonu Nucleodur® CN-RP (d) bylo eluční pořadí: 5-HMT, FES a TOL. Podmínky separace: průtok mobilní fáze: 0,3 ml/min, UV detekce:  $\lambda = 210$  nm.

Z hodnot retenčních faktorů jednotlivých látek  $k_n$  (Tabulka 3) je vidět, že s rostoucí aciditou mobilní fáze došlo ke zkrácení retence za použití všech kolon kromě Ascentis® C<sub>18</sub>, kde retenční faktory TOL a FES byly nižší při pH 5 než při pH 3 a retenční faktor 5-HMT byl nižší u pH 7 než při pH 5. S ohledem na případnou aplikaci metody - detekci studovaných antimuskarinik v plazmě a moči, kde jsou v prvních minutách analýzy eluovány matriční látky, bylo cílem najít kolonu a pH mobilní fáze, při kterém bude mít 5-HMT co nejdelší retenci a zároveň TOL a FES retenci co nejkratší, ovšem s rozlišením  $R_n \geq 1$ . Těmto požadavkům nejlépe vyhovovala kolona Nucleodur® CN-RP při pH 7. Retenční faktor  $k_1$  (pro 5-HMT) zde dosáhl uspokojivé hodnoty 2,82 a zároveň celková doba analýzy nepřekročila 15 min. Tento systém středně polární nitrilové stacionární fáze částečně potlačuje rozdíly v polaritě studovaných látek. Ve srovnání s ostatními kolonami polárnější 5-HMT je

stacionární fázi CN-kolony zadržován déle a méně polární TOL a FES jsou zadržovány kratší dobu.

*Tabulka 3 Přehled chromatografických parametrů 5-HMT, TOL a FES pro čtyři odlišné kolony a mobilní fáze (CH<sub>3</sub>CN/fosfátový pufr o koncentraci 0,05 mol/l, 30:70, v/v) o třech různých pH, tři měření*

Kolona	Parametry kolony	pH	$t_M \pm s_{t_M}$ (min)	$k_1 \pm s_{k_1}$	$k_2 \pm s_{k_2}$	$k_3 \pm s_{k_3}$	$R_{n1-2} \pm s_{R_{n1-2}}$	$R_{n2-3} \pm s_{R_{n2-3}}$
Nucleodur® PFP	5 $\mu$ m, 250 $\times$ 2 mm	3		1,50 $\pm$ 0,04	7,66 $\pm$ 0,17	8,53 $\pm$ 0,18	24,36 $\pm$ 0,65	2,33 $\pm$ 0,01
		5	1,84 $\pm$ 0,01	2,83 $\pm$ 0,01	16,54 $\pm$ 0,04	17,61 $\pm$ 0,04	31,42 $\pm$ 0,09	1,51 $\pm$ 0,04
		7		4,62 $\pm$ 0,02	33,34 $\pm$ 0,68	34,18 $\pm$ 0,67	41,63 $\pm$ 0,08	0,50 $\pm$ 0,02
Nucleodur® C <sub>8</sub> Gravity	5 $\mu$ m, 250 $\times$ 2 mm	3		1,22 $\pm$ 0,01	6,71 $\pm$ 0,03	8,20 $\pm$ 0,01	16,27 $\pm$ 0,49	3,64 $\pm$ 0,02
		5	1,84 $\pm$ 0,01	1,55 $\pm$ 0,01	8,75 $\pm$ 0,03	10,53 $\pm$ 0,02	19,55 $\pm$ 0,20	3,84 $\pm$ 0,04
		7		2,02 $\pm$ 0,01	12,54 $\pm$ 0,16	14,86 $\pm$ 0,14	20,85 $\pm$ 0,34	3,76 $\pm$ 0,26
Ascentis® C <sub>18</sub>	3 $\mu$ m, 100 $\times$ 2,1 mm	3		1,43 $\pm$ 0,11	8,72 $\pm$ 0,86	10,78 $\pm$ 1,13	8,72 $\pm$ 0,55	2,28 $\pm$ 0,16
		5	0,84 $\pm$ 0,01	1,56 $\pm$ 0,04	8,21 $\pm$ 0,08	9,54 $\pm$ 0,09	8,21 $\pm$ 0,99	1,83 $\pm$ 0,23
		7		1,53 $\pm$ 0,12	9,22 $\pm$ 0,45	12,44 $\pm$ 0,65	9,22 $\pm$ 0,57	2,25 $\pm$ 0,05
Nucleodur® CN-RP	3 $\mu$ m, 125 $\times$ 2 mm	3		1,05 $\pm$ 0,01	3,62 $\pm$ 0,02	3,78 $\pm$ 0,01	12,63 $\pm$ 0,50	0,66 $\pm$ 0,01
		5	1,09 $\pm$ 0,01	1,86 $\pm$ 0,01	6,28 $\pm$ 0,07	6,76 $\pm$ 0,08	14,86 $\pm$ 0,31	1,37 $\pm$ 0,01
		7		2,82 $\pm$ 0,01	9,94 $\pm$ 0,04	11,48 $\pm$ 0,05	17,82 $\pm$ 0,55	2,61 $\pm$ 0,05

$t_M$  – mrtvý čas kolony,  $R_n$  – rozlišení sousedících dvojic píků,  $k_n$  – retenční faktor,  $s_n$  – směrodatná odchylka ze tří měření, průtok mobilní fáze: 0,3 ml/min, UV detekce:  $\lambda = 210$  nm

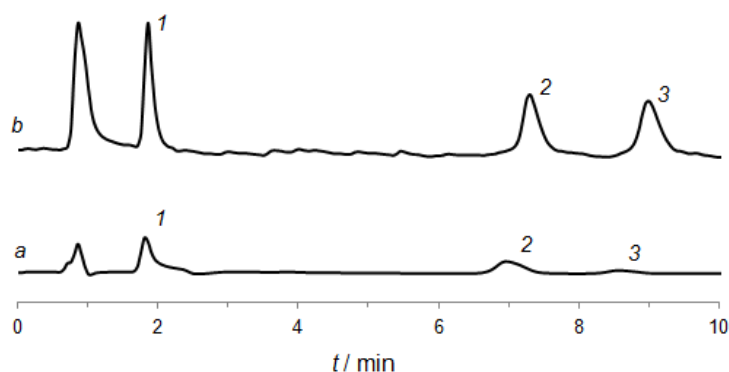
### 5.2.2. Elektrochemická detekce

Volba pracovní elektrody byla prvním důležitým bodem pro aplikaci elektrochemické detekce. Byla testována coulometrická cela s porézním grafitickým uhlíkem. Vlastnosti tohoto elektrodového materiálu dovolují maximální aplikovaný potenciál 800 mV. Při tomto potenciálu 5-HMT a TOL dávaly dobrý signál, naopak FES neposkytoval analyticky využitelnou odezvu (Obr. 5.24 a). Z tohoto důvodu bylo nutné zvolit pracovní elektrodu s širším použitelným potenciálovým rozsahem. Borem dopovaná diamantová elektroda má ve vodném prostředí využitelný potenciálový rozsah až 3,5 V. Na tomto elektrodovém materiálu je možno oxidovat látky, které se na ostatních elektrodových materiálech jen velmi těžko oxidují. Zároveň má nízký kapacitní odpor, vysokou chemickou stabilitu a nízké limity detekce až v jednotkách pmol [196]. Za použití BDD elektrody při 1500 mV byla odezva fesoterodinu srovnatelná se signály ostatních látek (Obr. 5.24 b). Z výše uvedených důvodů byla pro další experimenty zvolena amperometrická detekce s BDD elektrodou zapojená v sérii před referenční UV-Vis detektor.

Elektrochemická odezva studovaných látek na BDD elektrodě je závislá na pH. V závislosti plochy píků na aplikovaném potenciálu v rozsahu 1,4–1,8 V pro pH 3, 5 a 7 vykazovaly všechny látky evidentně vyšší elektrochemickou odezvu při pH 7 než

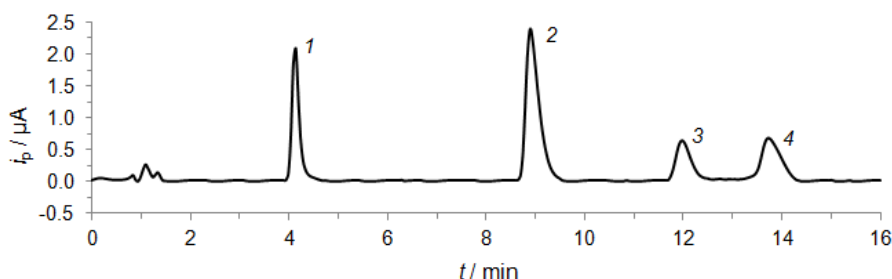


u kyselejších pH, což je v souladu s výsledky voltametrických měření, kdy u všech tří látek byly voltametrické odezvy intenzivnější v neutrální oblasti pH než v kyselé.



Obr. 5.24. Chromatogram 5-HMT (1), TOL (2) a FES (3) o koncentraci 16  $\mu\text{mol/l}$  separovaných na koloně Ascentis® C18 mobilní fází  $\text{CH}_3\text{CN}$ /fosfátový pufr pH 5 o koncentraci 0,05 mol/l (30:70, v/v). Coulometrický detektor s grafitickým uhlíkem při potenciálu 800 mV (a), amperometrický detektor s BDD elektrodou při potenciálu 1500 mV (b).

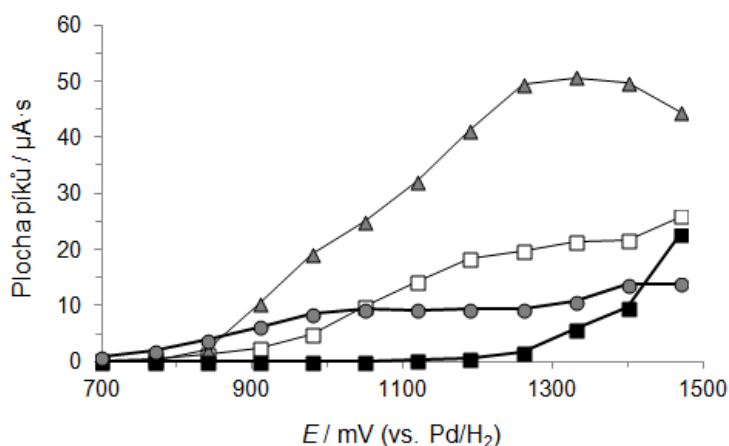
Pro případnou aplikaci metody stanovení 5-HMT, TOL a FES v moči a plazmě byl hledán vnitřní standard (IS), který by poskytoval výbornou elektrochemickou odezvu a zároveň by byl dobře separován od všech tří studovaných látek. Nejlépe těmto chromatografickým a elektrochemickým podmínkám vyhovoval isochinolinový alkaloid berberin (BER, Obr. 5.25), jehož elektrochemické chování již bylo dobře popsáno [59].



Obr. 5.25. Chromatogram modelové směsi 5-HMT (1), vnitřního standardu BER (2), FES (3) a TOL (4) o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ . HPLC parametry: kolona Nucleodur® CN-RP, mobilní fáze  $\text{CH}_3\text{CN}$ /fosfátový pufr pH 7 o koncentraci 0,05 mol/l (30:70, v/v), amperometrický detektor s BDD elektrodou s potenciálem 1,7 V.

Byly naměřeny hydrodynamické voltamogramy studovaných antimuskarinik a berberinu na koloně Nucleodur® CN-RP, s mobilní fází  $\text{CH}_3\text{CN}$ /fosfátový pufr pH 7 o koncentraci 0,05 mol/l (30:70, v/v) a amperometrickým detektorem s BDD elektrodou. Potenciál byl zvyšován po 70 mV v rozsahu od 0,7 V do 1,47 V (Obr. 5.26). Z voltamogramů je vidět, že FES začíná dávat elektrochemickou odezvu až při 1,19 V a se zvyšujícím se potenciálem jeho odezva rapidně narůstá. Signály TOL a 5-HMT se zvyšováním aplikovaného potenciálu narůstají pozvolna, což je v souladu s průběhy cyklických voltamogramů obou látek, které vykazují dva, resp. tři oxidační signály. Naproti tomu FES se

oxiduje pouze v jednom kroku, proto i nárůst proudu v hydrodynamickém voltamogramu je strmější. Rozdíly mezi potenciály, při kterých je dosaženo limitních hodnot proudů pro jednotlivé analyty, korespondují s rozdíly potenciálů CV píků z voltametrických analýz.



Obr. 5.26. Hydrodynamické voltamogramy 5-HMT (-□-), FES (-■-), TOL (-●-) a berberinu (-▲-) o koncentraci 10 µmol/l. HPLC parametry: kolona Nucleodur® CN-RP, mobilní fáze CH<sub>3</sub>CN/fosfátový pufr pH 7 o koncentraci 0,05 mol/l (30:70, v/v), amperometrický detektor s BDD elektrodou s postupně zvyšovaným potenciálem po 70 mV v rozsahu 0,70 – 1,47 V.

### 5.2.3. Analýza modelové směsi za zvolených podmínek

Na základě výše popsaných experimentů byly zvoleny finální podmínky separace tří antimuskarinik vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí za využití nového elektrodového materiálu, borem dopované diamantové elektrody. V izokratickém módu byla nalezena vhodná mobilní fáze CH<sub>3</sub>CN/fosfátový pufr o koncentraci 0,05 mol/l (30:70, v/v). Z hlediska separačních i elektrochemických podmínek nejlépe vyhovovalo neutrální pH mobilní fáze. Pro separaci 5-HMT, FES a TOL byly testovány čtyři různé typy kolon. S přihlédnutím na budoucí aplikace metody pro stanovení těchto látek v plazmě a moči nejlépe vyhovovala kolona Nucleodur® CN-RP. Za tímto účelem byl také nalezen vnitřní standard, berberin, který plně vyhovoval separačním i elektrochemickým požadavkům vnitřního standardu. Základní chromatografické parametry vyvinuté metody jsou shrnuty v *Tabulce 4*.

Na základě analýzy vzorků standardů na nízkých koncentračních hladinách byly odhadnuty meze detekce látek, kdy signál vzorku odpovídal přibližně trojnásobku šumu slepého pokusu. Pro 5-HMT odpovídala mez detekce 3 nmol/l, pro fesoterodin 9 nmol/l a pro tolterodin 2 nmol/l.

Tabulka 4 Chromatografické charakteristiky 5-HMT, FES, TOL a vnitřního standardu (IS) berberinu za zvolených podmínek

Látka	$k \pm s_k$	$R_n \pm s_R$
5-HMT	$2,81 \pm 0,01$	-
IS	$7,17 \pm 0,02$	$13,29 \pm 0,31$
FES	$9,98 \pm 0,03$	$5,88 \pm 0,10$
TOL	$11,58 \pm 0,03$	$2,72 \pm 0,04$

$k$  – retenční faktor,  $R_n$  – rozlišení sousedících dvojic píků,  $s_n$  – směrodatná odchylka ze tří měření,  $t_M \pm s_{t_M} = (1,09 \pm 0,01)$  min, průtok mobilní fáze: 0,3 ml/min, elektrochemická detekce při 1,7 V, koncentrace látek: 10  $\mu$ mol/l.

Koncentrace studovaných léčiv v lidské plazmě se pohybuje v jednotkách až desítkách nmol/l [126], v moči je koncentrace vyšší vzhledem k tomu, že většina léčiva je z těla vylučována právě močí (v metabolizované, či nezměněné podobě) [112]. Lze předpokládat, že navrhovaná metoda se může stát součástí postupu pro stanovení těchto léčiv v plazmě nebo moči. Pro použití metody ke stanovení látek v moči nebo plazmě by však bylo nutné provést kalibraci látek v odpovídající matici.

### 5.3. Elektrolýza antimuskarinik a analýza jejich oxidačních produktů metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Pro detailnější charakterizaci oxidačních produktů tolterodinu, fesoterodinu a jejich metabolitu 5-hydroxymethyltolterodinu byly provedeny série experimentů elektrolýzy za konstantního potenciálu na velkoplošné platinové elektrodě. Potenciál elektrooxidace byl zvolen na základě cyklických voltamogramů TOL, FES a 5-HMT zaznamenaných v různých prostředích (Tabulka 5). Elektrolyzáty byly následně analyzovány metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (UPLC/MS) s ionizací elektrosprejem a hybridním Q-TOF analyzátozem.

Tabulka 5 Přehled zvolených prostředí a aplikovaných potenciálů při elektrolýze pro tolterodin, fesoterodin a 5-hydroxymethyltolterodin.

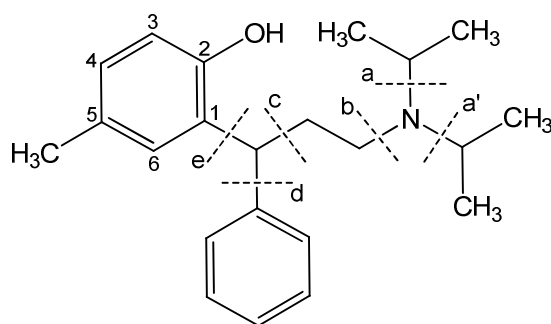
Látka	Prostředí	Potenciál elektrolýzy (mV)
TOL	CH <sub>3</sub> CN s 12,5 mmol/l LiClO <sub>4</sub>	200, 700, 1000
	CH <sub>3</sub> OH s 90 mmol/l CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	200, 700, 1000
	CH <sub>3</sub> OH/B-R pufr pH 3,5	500, 690 a 860
	CH <sub>3</sub> OH/B-R pufr pH 7,0	200, 430, 580 a 730
	CH <sub>3</sub> OH/B-R pufr pH 10,0	100, 280, 500 a 610
FES	CH <sub>3</sub> OH/B-R pufr pH 3,0	500, 1000 a 1150
	CH <sub>3</sub> OH/B-R pufr pH 7,0	200, 600 a 1000
5-HMT	CH <sub>3</sub> OH/B-R pufr pH 3,0	650 a 900
	CH <sub>3</sub> OH/B-R pufr pH 7,0	300, 500, 900
	CH <sub>3</sub> OH/B-R pufr pH 9,0	300, 500, 900

Níže jsou diskutována hmotnostní spektra, ve kterých lze přisoudit jednotlivým iontům uvedené ztráty, resp. jejich kombinace. Procesy fragmentace látek nebyly detailněji studovány. Jejich popis slouží k podpoře předpokládaných struktur, přičemž jejich jednoznačná verifikace by byla možná porovnáním získaných spekter se spektry standardů, které však nejsou pro řadu produktů studovaných elektrochemických přeměn k dispozici. Hmotnostní spektra však v kontextu znalostí elektrochemického chování poskytují další podpůrné informace užitečné pro pochopení zkoumaných procesů.

### 5.3.1. Elektrolyza tolterodinu

Elektrolyza tolterodinu byla prováděna ve směsném prostředí CH<sub>3</sub>OH/B-R pufr (1:1, v/v), ale také v nevodných prostředích (Tabulka 5), která byla zvolena k potlačení adsorpce oxidačních produktů na elektrodový povrch. Pro rozlišení produktů vznikajících elektrolyzou od případných dalších „neelektrolytických“ produktů byly chromatogramy a hmotnostní spektra srovnány s kontrolními roztoky TOL, které byly elektrolyzovány při nižším potenciálu, než je potenciál prvního anodického píku: 500 mV pro pH 3,5; 200 mV pro pH 7,0; 100 mV pro pH 10,0 a 200 mV pro nevodná prostředí. Za těchto podmínek by neměly probíhat žádné elektrochemické reakce tolterodinu.

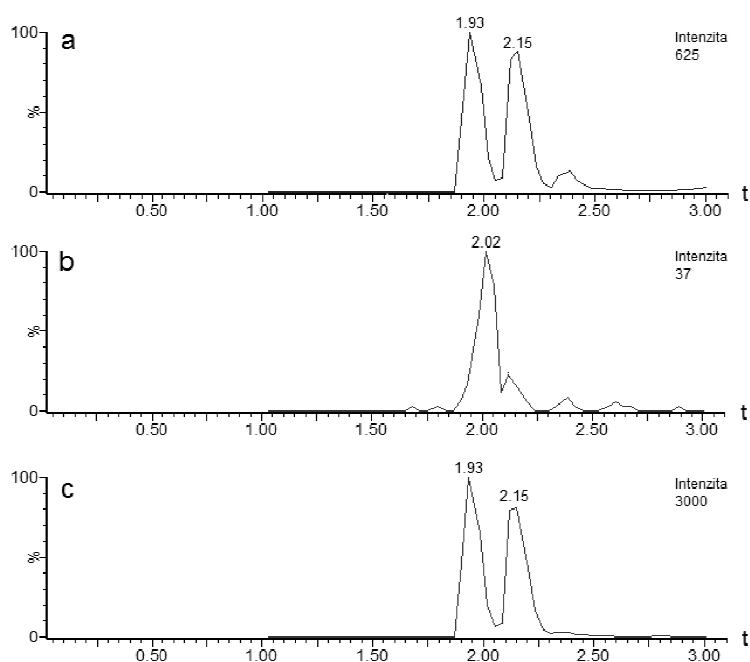
UPLC/MS analýzou vzorků tolterodinu byl zaznamenán pík s retenčním časem  $t_R = 2,8$  min odpovídající protonované molekule  $[M + H]^+$  s  $m/z$  326, která náleží tolterodinu. Tolterodin byl fragmentován (Obr. 5.27, Obr. 5.29 a) na ionty s  $m/z$  284 (ztráta propenu štěpením vazby a nebo a'),  $m/z$  197 (ztráta diisopropylaminu a ethenu štěpením vazeb b, c, event. přímo diisopropylethylaminu vazbou c, podobně u ostatních látek) a  $m/z$  147, ion s nejintenzivnějším píkem spektra, vznikl ztrátou diisopropylaminu, ethenu a benzenu štěpením vazeb b, c, d. Při fragmentaci dochází také ke štěpení vazby e za vzniku iontů s  $m/z$  117 (kombinace štěpení vazeb b, e) a  $m/z$  91 (kombinace štěpení vazeb b, c, e). Fragmentační spektrum tolterodinu je v souladu se spektrem uvedeným v literatuře [126]. Podrobnější přehled fragmentace tolterodinu je uveden v Příloze 1, str. 115.



Obr. 5.27. Naznačení fragmentace tolterodinu

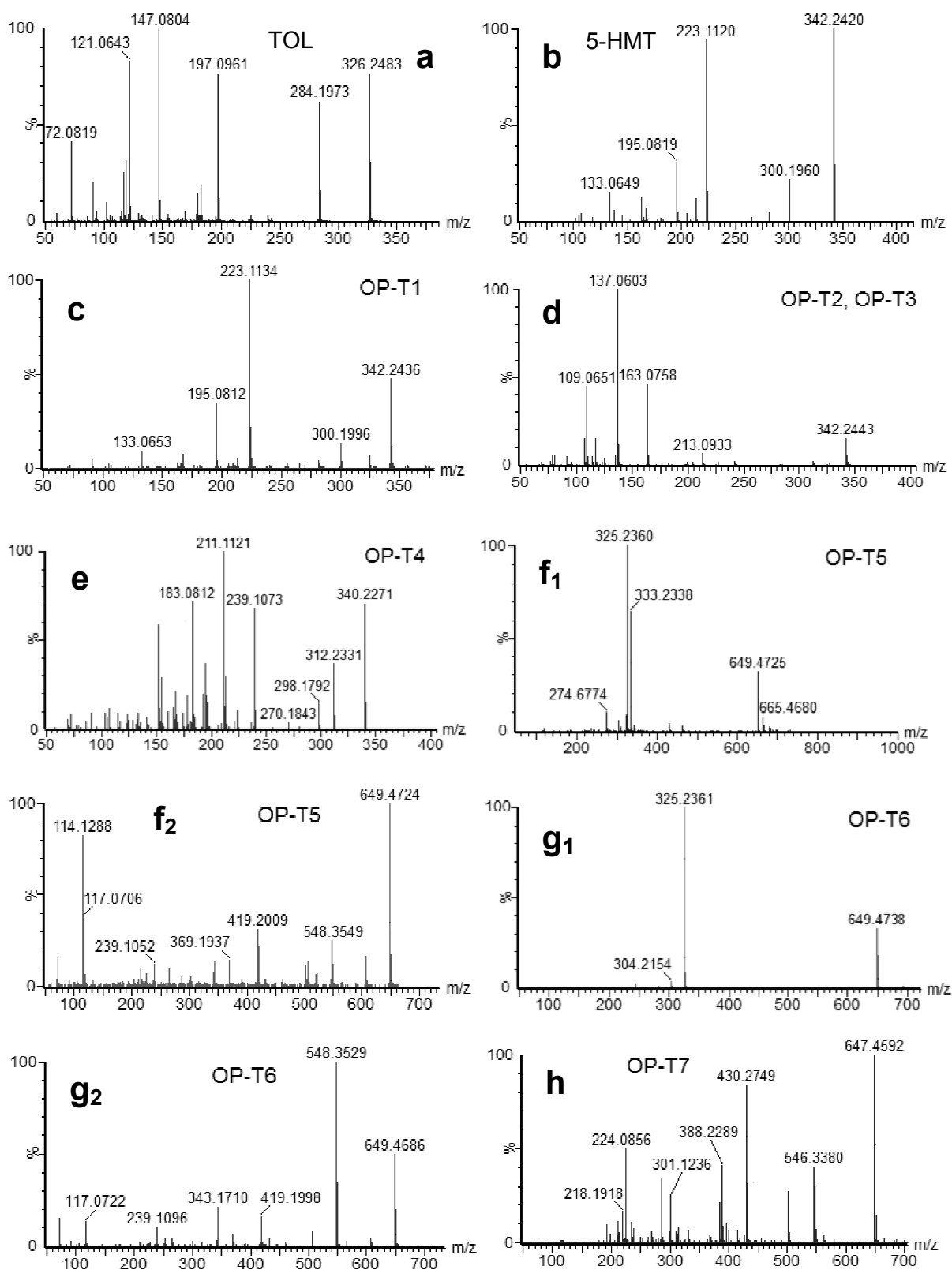
Elektrolyza všech vzorků tolterodinu při potenciálu voltametrického píku A vedla podle UPLC/MS analýzy ke vzniku produktu OP-T1. Hmotnostní spektrum této látky (Obr. 5.29 b, Příloha 4, str. 118) obsahuje stejné fragmentační ionty jako spektrum standardu 5-HMT (Obr. 5.29 c, Příloha 2, str. 116). Retenční časy OP-T1 a 5-HMT ( $t_R = 2,0$  min) se také shodují (Tabulka 6). Největší množství tohoto produktu bylo nalezeno v prostředí acetonitrilu a v pufovaném kyselém prostředí. Podle výše uvedených faktů byl elektrolyzou TOL získán jeho hlavní aktivní metabolit 5-HMT.

Další dva polární produkty OP-T2 ( $t_R = 1,9$  min) a OP-T3 ( $t_R = 2,1$  min) byly nalezeny ve větším množství ve vzorcích v prostředí  $\text{CH}_3\text{CN}$  elektrolyzovaných při potenciálu 1 V. Spektra obou produktů jsou identická (Obr. 5.29 d) s iontem prekursoru  $m/z$  342 stejně jako u 5-HMT (Tabulka 6). Nejintenzivnější fragmentový ion s  $m/z$  137, který vznikl ztrátou diisopropylaminu, ethynu a benzenu, nese dva atomy kyslíku na benzenovém jádře (Příloha 5, str. 119). Tento fakt napovídá, že OP-T2 a OP-T3 mohou být polohové izomery hydroxyderivátů tolterodinu s hydroxyskupinami vázanými na methylbenzenový kruh nejpravděpodobněji v polohách 4 a 6 (Schéma 8, str. 75). Separace tří izomerů s  $m/z$  342 je zobrazena pomocí jejich nejintenzivnějších fragmentů  $m/z$  223 pro OP-T1 a  $m/z$  137 pro OP-T2 a OP-T3 (Obr. 5.28).



Obr. 5.28. Chromatogram separace oxidačních produktů OP-T1, OP-T2 a OP-T3 ( $m/z$  342) získaný zobrazením pro  $m/z$  342 (a), pro nejintenzivnější fragmentový ion produktu OP-T1  $m/z$  223 (b) a nejintenzivnější fragmentový ion produktů OP-T2 a OP-T3  $m/z$  137 (c). Změřeno po elektrolyze při 1V roztoku TOL v prostředí  $\text{CH}_3\text{CN}$  s rampou kolizní energie 15 – 35 eV s předešlou separací iontu  $m/z$  342.

Produkt OP-T4 ( $t_R = 2,3$  min,  $m/z$  340) byl nalezen v roztoku elektrolyzovaném při potenciálu píku B v prostředí acetonitrilu a kyselém pufovaném prostředí. Ve fragmentačním spektru (Obr. 5.29 e) je intenzivní ztráta CO ( $\Delta 28$ ) projevující se fragmentovým ionem s  $m/z$  312, která u TOL ani 5-HMT není vidět. Nejintenzivnější fragmentový pík spektra s  $m/z$  211 pak odpovídá ztrátě CO a diisopropylaminu. Přehled fragmentů je uveden v Příloze 4, str. 118. Navíc stejný produkt vzniká také oxidací standardu 5-HMT, jak je popsáno níže (odd. 5.3.3). Podle sumárního vzorce a typické ztráty CO může být produktem OP-T4 5-formyl tolterodin.



Obr. 5.29. MS spektra tolterodinu (a), 5-hydroxymethyltolterodinu (b) a oxidačních produktů TOL: OP-T1 (c) OP-T2 a OP-T3 (d), OP-T4 (e), OP-T5 (f<sub>1,2</sub>), OP-T6 (g<sub>1,2</sub>) a OP-T7 (h) změřené po elektrolýze při 0,7 V (OP-T1, OP-T5, OP-T6 a OP-T7) a při 1,0 V (OP-T2, OP-T3 a OP-T4) na Pt-elektrodě v roztoku CH<sub>3</sub>CN/LiClO<sub>4</sub>. Spektra byla získána za použití rampy kolizní energie 15–35 eV s předešlou separací iontu (a, b, e, f<sub>2</sub>, g<sub>2</sub>), bez předešlé separace iontu (c, d, h), nebo při nižší kolizní energii 5 eV (f<sub>1</sub>, g<sub>1</sub>).

Kromě výše zmíněných produktů byly ve všech elektrolyzovaných roztocích nalezeny také dimerní produkty OP-T5 ( $t_R = 4,4$  min) a OP-T6 ( $t_R = 5,0$  min), které mají protonovanou molekulu s  $m/z$  649. Nejintenzivnější pík ( $m/z$  325) hmotnostního spektra obou látek pořízených při nižší kolizní energii (Obr. 5.29  $f_1, g_1$ ) náleží dvakrát protonované molekule  $[M + 2H]^{2+}$ . Oba dimery vznikly spojením dvou fenoxu radikálů, produktů jednoelektronové oxidace TOL. Produkt OP-T5 je polárnější, mohl by s větší pravděpodobností vznikat vazbou C–C, zatímco méně polární OP-T6 spíše přes vazbu C–O (Schéma 8, str. 75). Ve fragmentačních spektrech těchto dvou dimerů (Obr. 5.29  $f_2, g_2$ ) lze pozorovat fragmentační ionty se stejnými  $m/z$ , ale s různými intenzitami (Příloha 7 a 8, str. 121 a 122). S produktem OP-T5 koeluuje látka odpovídající pravděpodobně dimeru vzniklému spojením fenoxu radikálů TOL a 5-HMT ( $[M + H]^+$   $m/z$  665,  $[M + 2H]^{2+}$   $m/z$  333, Obr. 5.29  $f_1$ )

Další dimerní produkt OP-T7 ( $t_R = 4,3$  min,  $m/z$  647,  $[M + 2H]^{2+}$   $m/z$  324) byl identifikován v elektrolyzátu v prostředí acetonitrilu (Obr. 5.29 h). Rozdíl přesných hmotností OP-T5 a OP-T7 (Tabulka 6) odpovídá ztrátě dvou atomů vodíku u OP-T7. Produkt OP-T7 tedy může vznikat elektrooxidací OP-T5. Nižší polarita OP-T7 než OP-T5 podporuje toto tvrzení (Schéma 8, str. 75; Příloha 9, str. 123).

Vedle uvedených hlavních oxidačních produktů tolterodinu byly nalezeny v malém množství také vedlejší produkty, které vznikají reakcí s rozpouštědlem. Během elektrolýzy v prostředí  $CH_3CN/LiClO_4$  vznikl acetamidací (Schéma 6) [197] produkt s protonovanou molekulou s  $m/z$  383 ( $t_R = 1,8$  min). Podobně elektrolýzou v kyselém vodně methanolickém prostředí vzniká produkt s  $m/z$  356 ( $t_R = 2,5$  min), který odpovídá methoxyderivátu tolterodinu (Schéma 7).

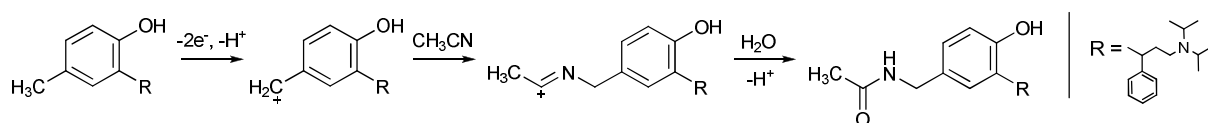


Schéma 6 Oxidativní acetamidace tolterodinu

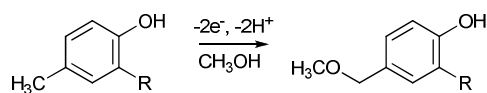


Schéma 7 Oxidativní methoxylace tolterodinu



Tabulka 6 UPLC/MS charakteristiky tolterodinu a jeho oxidačních produktů

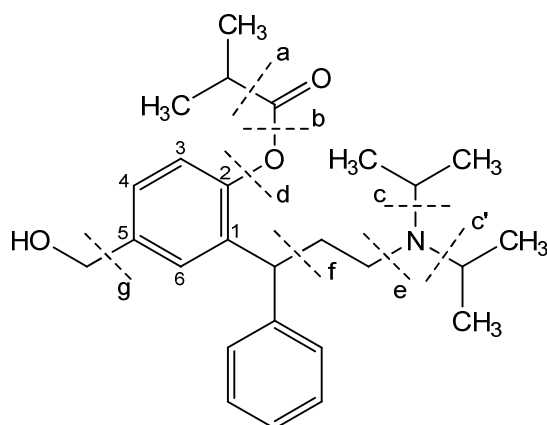
Látka	$t_R$ (min)	$[M + H]^+$ ( $m/z$ )	Sumární vzorec	Chyba (ppm)
Tolterodin	2,8	326,2483	$C_{22}H_{32}NO$	-0,3
5-HMT	2,0	342,2420	$C_{22}H_{32}NO_2$	-3,8
OP-T1 } izomery	2,0	342,2436	$C_{22}H_{32}NO_2$	0,9
OP-T2 }	1,9	342,2443	$C_{22}H_{32}NO_2$	2,9
OP-T3 }	2,1	342,2436	$C_{22}H_{32}NO_2$	0,9
OP-T4	2,3	340,2271	$C_{22}H_{30}NO_2$	-1,8
OP-T5 (dimer) } izomery	4,4	649,4724	$C_{44}H_{61}N_2O_2$	-1,4
OP-T6 (dimer) }	5,0	649,4686	$C_{44}H_{61}N_2O_2$	-7,2
OP-T7 (dimer)	4,3	647,4592	$C_{44}H_{59}N_2O_2$	2,3

$t_R$  – retenční čas, Chyba – relativní rozdíl mezi teoreticky vypočtenou hmotností iontu a experimentálně získanou

### 5.3.2. Elektrolyza fesoterodinu

Fesoterodin byl elektrolyzován v prostředích CH<sub>3</sub>OH/B-R pufr (1:1, v/v) pH 3,0 a 7,0. Použití vyššího pH pro elektrolyzu FES bylo vyloučeno z důvodu jeho samovolné hydrolyzy na 5-HMT v alkalickém prostředí (viz kapitola 5.1.2). Pro rozlišení produktů vznikajících elektrolyzou od případných dalších „neelektrolytických“ produktů byly chromatogramy a hmotnostní spektra srovnány s daty pro kontrolní roztoky FES, které byly elektrolyzovány při nižším potenciálu, než je potenciál prvního anodického píku: 500 mV pro pH 3,0 a 200 mV pro pH 7,0. Za těchto podmínek by neměly probíhat žádné elektrochemické reakce fesoterodinu.

UPLC/MS analýzou elektrolyzovaných vzorků a standardu FES byl zaznamenán pík s retenčním časem  $t_R = 3,0$  min protonované molekuly  $[M + H]^+$   $m/z$  412, která náleží fesoterodinu. Jeho fragmentace (Obr. 5.30, Obr. 5.31 a) poskytuje ionty:  $m/z$  370 (štěpení vazby a nebo c),  $m/z$  342 (štěpení vazeb a, b, event. přímo b),  $m/z$  300 (štěpení vazeb a–c, event. b, c),  $m/z$  282 (štěpení vazeb a–d, event. přímo d), nejintenzivnější pík spektra pík spektra s  $m/z$  223 (štěpení vazeb a–e, event. e, d),  $m/z$  195 (štěpení vazeb a–f, event. d, f) a ion s  $m/z$  167 (a–g, event. d, f, g, Příloha 3, str. 117). Eventuality štěpení vazeb nastávají podobně u produktů oxidace FES.

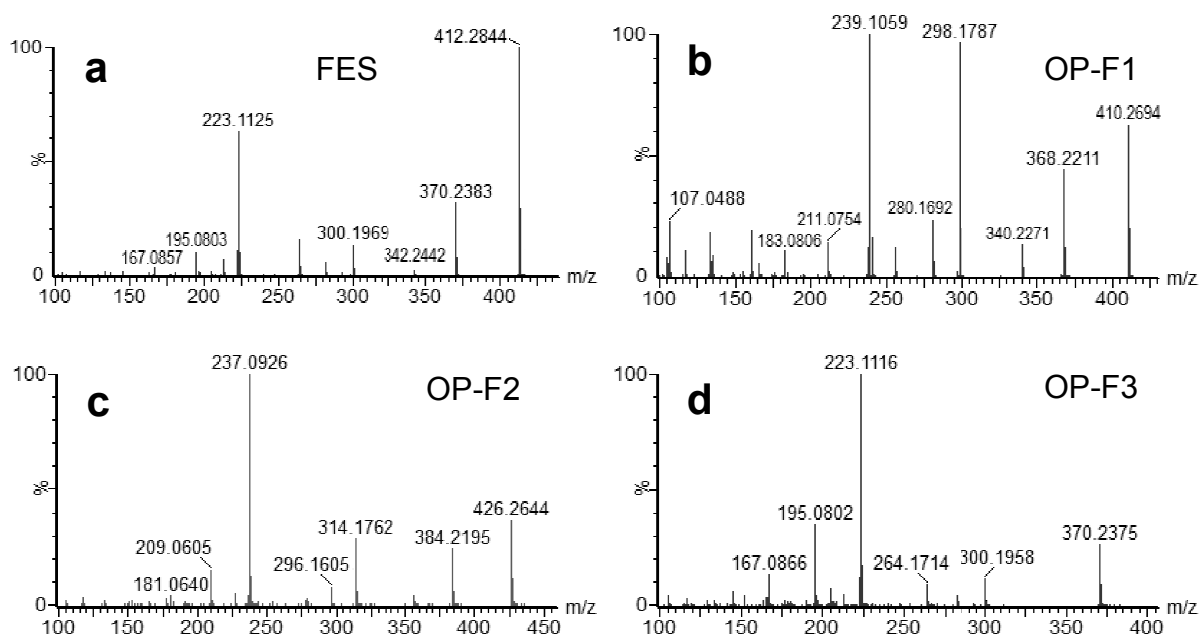


Obr. 5.30. Naznačení fragmentace fesoterodinu

U všech elektrolyzovaných vzorků FES byl v retenčním čase  $t_R = 3,3$  min nalezen produkt OP-F1, přičemž výrazně větší množství této látky bylo získáno elektrolyzou při vyšších hodnotách potenciálu (1,15 V pro pH 3,0 a 1 V pro pH 7,0). Podle sumárního vzorce (Tabulka 7) má tento produkt o dva atomy vodíku méně než FES. Analogicky k produktu oxidace TOL OP-T4 (5-formyl tolterodinu), může být OP-F1 5-formyl fesoterodin. Nejintenzivnější pík jeho fragmentačního spektra s  $m/z$  239 (Obr. 5.31 b,

Příloha 10, str. 124) odpovídá ztrátě propenu, CO (event. 2-methylprop-1-en-1-onu) a diisopropylaminu. Na rozdíl od FES nedochází v případě OP-F1 ke ztrátě H<sub>2</sub>O, což naznačuje jinou substituci v poloze 5 (místo hydroxymethylu aldehydická skupina).

Produkt OP-F2 s retenčním časem  $t_R = 2,5$  min a protonovanou molekulou  $[M + H]^+$  s  $m/z$  426 je polárnější než fesoterodin a vzniká v kyselém i neutrálním prostředí především při vyšších potenciálech (1,15 V pro pH 3,0; 1 V pro pH 7,0). Podle sumárního vzorce (Tabulka 7) má OP-F2 oproti FES o dva atomy vodíku méně a jeden atom kyslíku navíc. Nejintenzivnější fragmentový ion jeho spektra (Obr. 5.31 c) s  $m/z$  237 odpovídá, stejně jako u FES štěpení vazeb a–e, event. d, e. Ve spektru je pozorovatelný fragmentový ion s  $m/z$  153, který odpovídá ztrátě diisopropylaminu, ethenu, kyseliny isomáselné a dvou molekul CO, což potvrzuje přítomnost čtyř atomů kyslíku ve struktuře produktu OP-F2 (Příloha 11, str. 125). Výše uvedená fakta napovídají, že produkt OP-F2 by mohl vznikat hydroxylací produktu OP-F1. Nejpravděpodobněji by se hydroxyskupina mohla vázat na substituované benzenové jádro do polohy 3 (Schéma 9, str. 76).



Obr. 5.31. MS spektrum standardu fesoterodinu (a) a jeho produktů oxidace: OP-F1 (b), OP-F2 (c), OP-F3 (d) změřené po elektrolýze FES při 1 V na Pt-elektrodě v prostředí o pH 7,0. Spektra byla získána za použití rampy kolizní energie 15–35 eV s předešlou separací iontu spektra.

Produktu OP-F3 bylo nalezeno největší množství v neutrálním prostředí při potenciálu elektrolýzy 1 V. Retenční čas této látky s protonovanou molekulou  $[M + H]^+$  s  $m/z$  370 je  $t_R = 2,7$  min. Totožnou hmotnost s přesností na dvě desetinná místa a shodné elementární složení má rovněž druhý nejintenzivnější fragmentový ion FES. Navíc fragmentové ionty MS<sup>2</sup> spektra tohoto produktu (Obr. 5.31 d) jsou shodné s fragmentovými ionty FES  $< m/z$  370

(Obr. 5.31 a, Příloha 3 a 12, str. 117 a 126). Látka se stejnou molární hmotností byla nalezena jako produkt degradace FES působením UV-C záření (100 – 280 nm), kde došlo k *N*-dealkylaci, odtržení isopropylové skupiny z dusíku. Fotodegradace látky bývá nejčastěji způsobena oxidací nebo rozpadem některé slabé chemické vazby [198]. Podle výše uvedených faktů produkt OP-F3 velmi pravděpodobně vznikl *N*-dealkylací FES (Schéma 9, str. 76).

Tabulka 7 UPLC/MS charakteristiky fesoterodinu a jeho oxidačních produktů

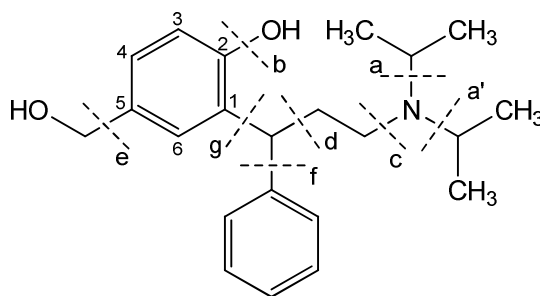
Látka	$t_R$ (min)	$[M + H]^+$ ( $m/z$ )	Sumární vzorec	Chyba (ppm)
Fesoterodin	3,0	412,2844	$C_{26}H_{38}NO_3$	-1,9
OP-F1	3,3	410,2694	$C_{26}H_{36}NO_3$	-0,2
OP-F2	2,5	426,2644	$C_{26}H_{36}NO_4$	0,0
OP-F3	2,7	370,2375	$C_{23}H_{32}NO_3$	-1,9

$t_R$  – retenční čas, Chyba – relativní rozdíl mezi teoreticky vypočtenou hmotností iontu a experimentálně získanou

### 5.3.3. Elektrolýza 5-hydroxymethyltolterodinu

Elektrolýza 5-hydroxymethyltolterodinu byla prováděna v prostředích  $CH_3OH/B-R$  pufr (1:1, v/v) pH 3,0; 7,0 a 9,0. Pro rozlišení produktů vznikajících elektrolýzou od případných dalších „neelektrolytických“ produktů byly chromatogramy a hmotnostní spektra srovnány s daty pro kontrolní roztoky 5-HMT, které byly elektrolyzovány při nižším potenciálu, než je potenciál prvního anodického píku: 650 mV pro pH 3,0 a 300 mV pro pH 7,0 a 9,0. Za těchto podmínek by neměly probíhat žádné elektrochemické reakce 5-HMT.

UPLC/MS analýzou standardu a elektrolyzovaných vzorků 5-HMT byl zaznamenán pík s retenčním časem  $t_R = 2,0$  min a protonovanou molekulou  $[M + H]^+$   $m/z$  342 náležící 5-HMT. Jeho fragmentace (Obr. 5.33 a) je naznačena na Obr. 5.32 a jednotlivé ztráty jsou popsány v Příloze 2, str. 116.



Obr. 5.32. Naznačení fragmentace 5-hydroxymethyltolterodinu

### ***Produkt elektrolýzy 5-HMT s $m/z$ 340***

Elektrolýza všech vzorků 5-HMT při potenciálu píku A vedla podle UPLC/MS analýzy ke vzniku produktu OP-H1 s retenčním časem  $t_R = 2,3$  min (*Tabulka 8*) a protonovanou molekulou  $[M + H]^+$   $m/z$  340. Nejintenzivnější fragmentový ion spektra (Obr. 5.33 b).  $m/z$  239 odpovídá ztrátě diisopropylaminu (Příloha 13, str. 127). U produktu OP-H1 nebyly pozorovány ztráty, které by naznačovaly přítomnost 5-hydroxymethylové skupiny (ztráta vody nebo formaldehydu nebo methanolu). Oxidací 5-HMT mohlo dojít k dehydrogenaci 5-hydroxymethylové skupiny na aldehydickou skupinu (*Schéma 10*, str. 77). Tuto hypotézu podporují výsledky voltametrických analýz (odd. 5.1.3), které také ukazují na vznik 5-formyl tolterodinu v prvním oxidačním kroku 5-HMT. Stejná látka byla nalezena při oxidaci tolterodinu (OP-T4) popsaného výše, jedná se pravděpodobně o sekundární produkt oxidace TOL.

### ***Produkt elektrolýzy 5-HMT s $m/z$ 326***

Při elektrolýze 5-HMT v kyselém a neutrálním prostředí byl v čase  $t_R = 2,4$  min zaznamenán produkt OP-H2 se stejnou hmotností jako TOL ( $m/z$  326), avšak jejich fragmentační spektra (Obr. 5.29 a, Obr. 5.33 c) a retenční časy se značně liší (*Tabulka 6 a 8*). Větší množství produktu OP-H2 vzniká při vyšších potenciálech. Voltametrickými experimenty byl zjištěn vznik *p*-benzochinonu v molekule 5-HMT ve druhém oxidačním kroku (B) 5-HMT. Této látce odpovídá hmotnost  $m/z$  326. V hmotnostním spektru produktu OP-H2 (Obr. 5.33 c) je pozorovatelná ztráta dvou CO (Příloha 14, str. 128), které se mohly odtrhnout právě z *p*-benzochinonu (*Schéma 10*, str. 77). Tato hypotéza je také podpořena shodou maxim UV-Vis spekter produktu OP-H2 (250 nm, 295 nm a 330 nm) pořízeného simultánně se záznamem MS spektra na PDA detektoru a naměřeného UV-Vis spektra standardu *p*-benzochinonu v prostředí voda/methanol (1:1, v/v).

### ***Produkty elektrolýzy 5-HMT s $m/z$ 356***

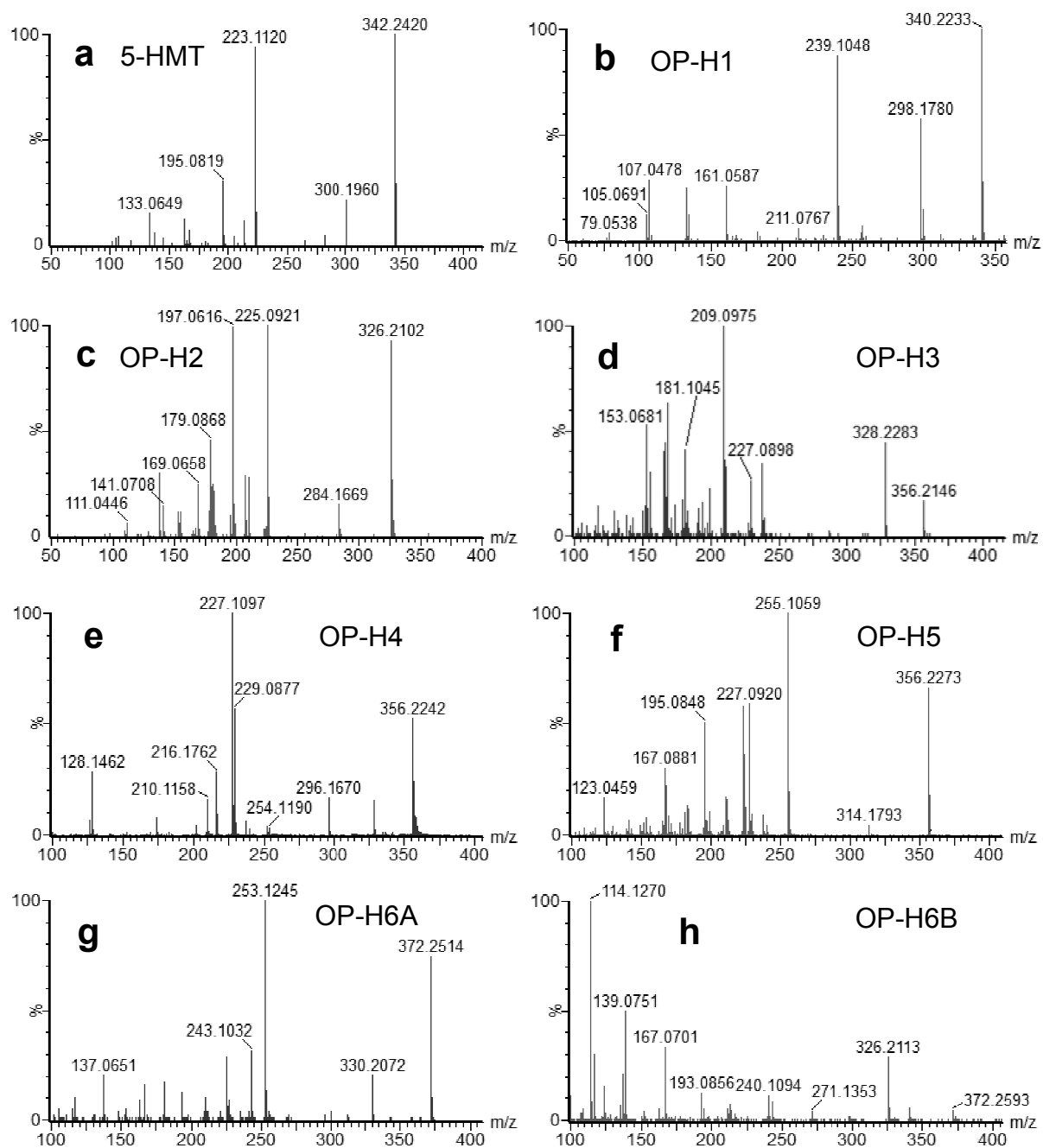
V roztocích 5-HMT elektrolyzovaných při potenciálu píku B byly nalezeny tři produkty se stejnou hmotností protonované molekuly  $[M + H]^+$   $m/z$  356, ale rozdílnými fragmentačními spektry (Obr. 5.33 d, e, f). Z elementárního složení všech tří izomerů s  $m/z$  356 (*Tabulka 8*) je zřejmé, že produkty budou mít na rozdíl od 5-HMT jeden atom kyslíku navíc a o dva atomy vodíku méně. Nejpolárnější z nich OP-H3, který je zároveň nejpolárnější ze všech produktů elektrolýzy 5-HMT, vycházel z kolony s retenčním časem  $t_R = 1,8$  min a vznikal elektrolýzou především v kyselém prostředí (pH 3,0; 900 mV). Stejně jako u produktu OP-H1, kde došlo

k dehydrogenaci 5-hydroxymethylové skupiny na aldehydickou, je u produktu OP-H3 v MS<sup>2</sup> spektru (Obr. 5.33 d, Příloha 15, str. 129) pozorována ztráta CO, což naznačuje, že tento produkt by mohl také obsahovat aldehydickou skupinu. Byly pozorovány tři neutrální ztráty obsahující kyslík (kombinace ztrát CO a H<sub>2</sub>O), což naznačuje přítomnost aldehydické skupiny a dvou hydroxy skupin na benzenovém jádře. Ztráta H<sub>2</sub>O je snadná pro dvě hydroxyskupiny na benzenovém jádře navázané navzájem v *o*-poloze. V literatuře je ve fragmentačním spektru pyrokatecholu získaného různými ionizačními technikami (EI [199] nebo APCI [200]) vidět intenzivní ion po odštěpení vody z molekuly pyrokatecholu. Nejintenzivnější fragmentový ion spektra produktu OP-H3 *m/z* 209 odpovídá ztrátě CO, vody a diisopropylaminu. Během elektrolýzy 5-HMT tedy s velkou pravděpodobností dochází k hydroxylaci produktu OP-H1 do polohy 3 za vzniku produktu OP-H3, *Schéma 10*, str. 77).

Druhý izomer s *m/z* 356, produkt OP-H4, vycházel z kolony v čase  $t_R = 2,1$  min a jeho největší množství bylo nalezeno v neutrálním roztoku 5-HMT elektrolyzovaném při potenciálu 900 mV. Při měření MS<sup>2</sup> spektra tohoto produktu s rampou vyšší kolizní energie 10–20 eV, 15–30 eV, nebo 15–35 eV byl ion prekurzoru zcela fragmentován a ve spektru tak nebyl znatelný. Po snížení energie na 5–15 eV byl ion prekurzoru  $[M + H]^+$  *m/z* 356 již pozorovatelný (Obr. 5.33 e). Nejintenzivnější pík spektra *m/z* 227 odpovídal ztrátě diisopropylaminu a CO. Ve spektru byl také pozorovatelný pík s *m/z* 296 odpovídající ztrátě CO a CH<sub>3</sub>OH (Příloha 16, str. 130). Na rozdíl od OP-H3 je u produktu OP-H4 pozorovatelná ztráta methanolu, což vede k domněnce, že 5-hydroxymethylová skupina zde zůstává nezměněna. Ve spektru byly nalezeny fragmentační ionty s *m/z* 153 odpovídající hmotnosti molekuly 4-(hydroxymethyl)-3-methylcyklohex-3,5-dien-1,2-dionu a *m/z* 139 korespondující s hmotností molekuly 4-(hydroxymethyl)cyklohex-3,5-dien-1,2-dionu. Struktura OP-H4 by tedy mohla obsahovat *o*-chinon (*Schéma 10*, str. 77).

Třetím, nejméně polárním izomerem *m/z* 356 je produkt OP-H5 s retenčním časem  $t_R = 2,3$  min. Jako jediný z těchto tří izomerů vznikal i v zásaditém prostředí, kde bylo nalezeno jeho největší množství (pH 9,0; 900 mV). Stejně jako u OP-H4 je v MS<sup>2</sup> spektru (Obr. 5.33 f, Příloha 17, str. 131) pozorovatelná ztráta CH<sub>3</sub>OH, ale zároveň je vidět ztráta H<sub>2</sub>O a diisopropylaminu ( $\Delta$  119) jako u standardu 5-HMT (u OP-H4 tato ztráta není). Ve spektru je také pozorovatelný fragmentový ion s *m/z* 123 odpovídající hmotnosti molekuly 4-hydroxybenzaldehydu a fragmentový ion s *m/z* 105 korespondující s hmotností molekuly 4-methylcyklohex-2,5-dionu. Uvedená fakta vedou k závěru, že oxidace u produktu

OP-H5 by mohla být směřována na nesubstituované benzenové jádro do *p*-polohy (Schéma 10, str. 77).



Obr. 5.33. MS spektrum standardu 5-HMT (a) a jeho oxidačních produktů: OP-H1 (b), OP-H2 (c), OP-H3 (d), OP-H4 (e), OP-H5 (f), OP-H6A (g) a OP-H6B (h) změřené po elektrolýze 5-HMT při 0,9 V v roztoku o pH 3 (OP-H1, OP-H3), pH 7 (OP-H2, OP-H4, OP-H6A a OP-H6B) a pH 9 (OP-H5). Spektra byla získána za použití rampy kolizní energie 15–35 eV bez předešlé separace iontu (b, c) a s předešlou separací iontu (a, d, f–h). Spektrum (e) bylo získáno za použití rampy kolizní energie 5–15 eV s předešlou separací iontu.

### **Produkt elektrolýzy 5-HMT s $m/z$ 372**

V roztocích 5-HMT elektrolyzovaných při potenciálu píku B byly nalezeny dva produkty OP-H6A a OP-H6B s protonovanou molekulou  $[M + H]^+$   $m/z$  372. Největší množství obou produktů bylo nalezeno v roztocích o neutrálním pH (900 mV). Produkt OP-H6A byl z kolony eluován v retenčním čase  $t_R = 2,1$  min a produkt OP-H6B v čase  $t_R = 2,6$  min (*Tabulka 8*).

Fragmentační spektra obou izomerů jsou odlišná (Obr. 5.33 g, h), některé fragmentové ionty však mají společné (Příloha 18 a 19, str. 132 a 133) ovšem s různou intenzitou. V obou spektrech jsou pozorovatelné především ztráty vody, formaldehydu, diisopropylaminu a benzenu. V  $MS^2$  spektru produktu OP-H6B jsou navíc zřejmé ztráty methoxylového radikálu. Produkt OP-H6B by tedy mohl vznikat methoxylací 5-HMT do polohy 5, která je již obsazená hydroxymethylem za vzniku odpovídajícího cyklohexadienonu (*Schéma 10*, str. 77). V literatuře je substituce do již obsazené pozice na benzenovém jádře popsána [89]. U produktu OP-H6A je ve spektru viditelná ztráta diisopropylaminu a vody ( $\Delta$  119) stejně jako u 5-HMT a OP-H5. Produkt OP-H6A by mohl vznikat methoxylací na substituované benzenové jádro 5-HMT s velkou pravděpodobností do polohy 3 (*Schéma 10*, str. 77).

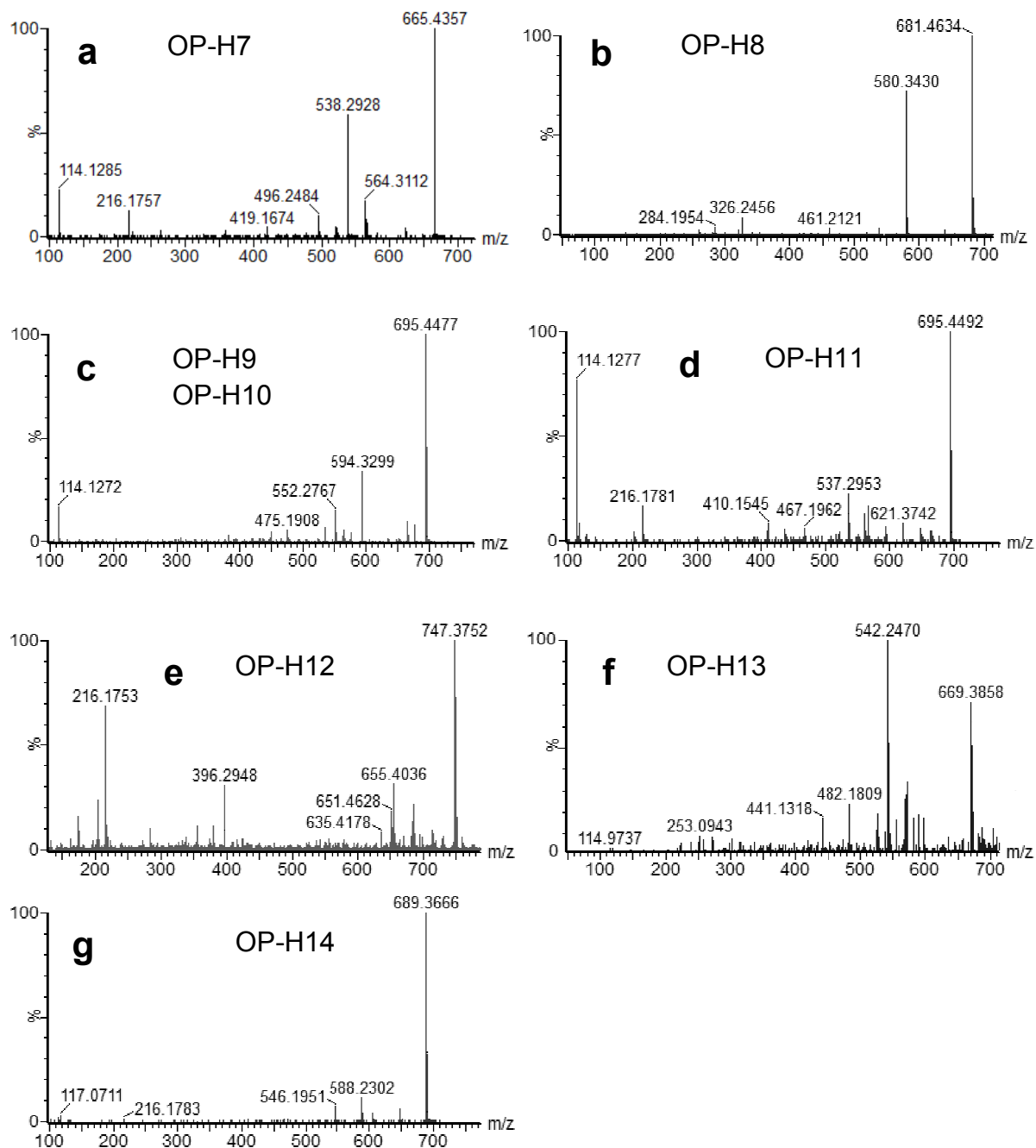
### **Dimerní produkty elektrolýzy 5-HMT**

Elektrolýzou 5-HMT v kyselém prostředí při potenciálu 900 mV vzniká mnoho strukturně odlišných dimerů (OP-H7 – OP-H14) s rozdílnou retencí (*Tabulka 8*). V čase  $t_R = 2,8$  min byl nalezen produkt OP-H7 s protonovanou molekulou  $[M + H]^+$   $m/z$  665. Podle sumárního vzorce (*Tabulka 8*) by mohlo jít o dimer vzniklý spojením 5-HMT a OP-H2 (chinon). Nejintenzivnější fragmentový ion spektra (Obr. 5.34 a) s  $m/z$  538 odpovídá ztrátě *N*-isopropyl-*N*-vinylpropan-2-aminu (Příloha 20, str. 134). Dimer OP-H7 by mohl vznikat vazbou C–C nejpravděpodobněji v polohách 3 (*Schéma 10*, str. 77).

Další dimerní produkt OP-H8 poskytoval chromatografický pík v čase  $t_R = 2,9$  min s protonovanou molekulou  $[M + H]^+$   $m/z$  681. Podle sumárního vzorce (*Tabulka 8*) se jedná o dimer vzniklý spojením dvou molekul 5-HMT. Tento dimer byl jako jediný přítomen i v zásaditém prostředí, přičemž jeho největší množství obsahoval vzorek elektrolyzovaný v roztoku o pH 9,0 při potenciálu píku A (500 mV). Vyšší obsah produktu OP-H8 v alkalickém prostředí, oproti kyselému a neutrálnímu prostředí, je zřejmě důsledkem menší koncentrace monomerních produktů oxidace 5-HMT schopné tvořit dimery v alkalickém prostředí. Ve fragmentačním spektru (Obr. 5.34 b) je pozorovatelná ztráta maximálně tří atomů kyslíku ve formě vody, CO nebo formaldehydu (Příloha 21, str. 135). Dimer by mohl



vzniknout tvorbou vazby C–O, do které je zapojen pravděpodobně kyslík z hydroxyskupiny vázané přímo na benzenové jádro a uhlík v poloze 3 (Schéma 10, str. 77).



Obr. 5.34. MS spektra dimerních oxidačních produktů 5-HMT: OP-H7 (a), OP-H8 (b), OP-H9 a OP-H10 (c), OP-H11 (d), OP-H12 (e), OP-H13 (f) a OP-H14 (g) změřené po elektrolýze 5-HMT při 0,9 V v roztoku o pH 3 (OP-H7, OP-H9, OP-H10, OP-H11 a OP-H14) a při 0,5 V v roztoku o pH 9 (OP-H8, OP-H12 a OP-H13). Spektra byla získána za použití rampy kolizní energie 15–35 eV bez předešlé separace iontu (b, e, f) a s předešlou separací iontu (a, c, d, g).

Další dimer OP-H9 byl zaznamenán v retenčním čase  $t_R = 2,6$  min s protonovanou molekulou  $[M + H]^+$   $m/z$  695. V čase  $t_R = 2,7$  min se eluoval dimer OP-H10 se stejnou hmotností, sumárním vzorcem i shodným fragmentačním spektrem (Obr. 5.34 c). V čase  $t_R = 3,3$  min byl eluován produkt OP-H11 také se stejným sumárním vzorcem, ale odlišným

fragmentačním spektrem než předchozí dva dimery (Obr. 5.34 d). Všechny tyto tři izomerní dimery se podle sumárního vzorce a přesných hmot (*Tabulka 8*) skládají z jedné molekuly 5-HMT a jedné molekuly produktu OP-H3, OP-H4 nebo OP-H5. Naskýtá se zde několik možností navázání jednotlivých produktů na 5-HMT. Ke vzniku těchto dimerů může dojít přes uhlíky v různých polohách, přes vazbu C–O s mnoha kombinacemi propojení nebo v úvahu přichází vazba mezi dvěma kyslíky. Kvůli četnému množství možných kombinací lze tedy jen velmi obtížně odhadnout struktury těchto tří izomerů OP-H9 až OP-H11.

*Tabulka 8 UPLC/MS charakteristiky 5-HMT a jeho oxidačních produktů*

Látka	$t_R$ (min)	$[M + H]^+$ ( $m/z$ )	Sumární vzorec	Chyba (ppm)
5-HMT	2,0	342,2420	$C_{22}H_{32}NO_2$	-3,8
OP-H1	2,3	340,2233	$C_{22}H_{30}NO_2$	-12,9
OP-H2	2,4	326,2102	$C_{21}H_{28}NO_2$	-5,5
OP-H3	1,8	356,2146	$C_{22}H_{30}NO_3$	-14,9
OP-H4				
OP-H5				
OP-H6A	2,1	372,2514	$C_{23}H_{34}NO_3$	-6,7
OP-H6B				
OP-H7 (dimer)	2,8	665,4357	$C_{43}H_{57}N_2O_4$	5,9
OP-H8 (dimer)	2,9	681,4634	$C_{44}H_{61}N_2O_4$	0,4
OP-H9 (dimer)	2,6	695,4477	$C_{44}H_{59}N_2O_5$	5,3
OP-H10 (dimer)				
OP-H11 (dimer)				
OP-H12 (dimer)	3,8	747,3752	$C_{45}H_{51}N_2O_8$	14,3
OP-H13 (dimer)	4,0	669,3858	$C_{41}H_{53}N_2O_6$	-6,9
OP-H14 (dimer)	4,2	689,3666	$C_{43}H_{49}N_2O_6$	10,9

$t_R$  – retenční čas, Chyba – relativní rozdíl mezi teoreticky vypočtenou hmotností iontu a experimentálně získanou

Dále byly zaznamenány dimery v retenčních časech  $t_R = 3,8$  min (OP-H12),  $t_R = 4,0$  min (OP-H13) a  $t_R = 4,2$  min (OP-H14). V MS spektrech můžeme najít jejich protonované molekuly  $[M + H]^+$   $m/z$  747 (OP-H12, Obr. 5.34 e),  $[M + H]^+$   $m/z$  669 (OP-H13, Obr. 5.34 f) a  $[M + H]^+$   $m/z$  689 (OP-H14, Obr. 5.34 g). Z MS spekter a sumárních vzorců (*Tabulka 8*) je jejich struktura jen obtížně odhadnutelná, protože nevznikají sloučením molekul již navrhovaných struktur.

Bližší popis jednotlivých struktur produktů elektrolýz by byl možný z NMR spekter, jejichž získání by však bylo v tomto případě velmi obtížné z důvodu nedostačujících výtěžků oxidačních produktů při elektrolýze pro NMR analýzu.

## 5.4. Mechanismus elektrochemické oxidace antimuskarinik

Z výsledků voltametrických experimentů a elektrolýzy za konstantního potenciálu s následnou analýzou oxidačních produktů pomocí UPLC/MS byl navržen mechanismus elektrochemické oxidace všech tří studovaných látek (TOL, FES a 5-HMT).

### 5.4.1. Mechanismus oxidace tolterodinu

Navržený mechanismus oxidace tolterodinu je znázorněn ve *Schématu 8*. V prvním reakčním kroku (pík A) dochází k jednoelektronové oxidaci, která může vést ke vzniku benzylového radikálu (**1**), který může být dále oxidován na benzylový kation [197] a hydrolyzován za vzniku 5-HMT (OP-T1). Další možné tautomerní formy benzylového radikálu (**2**, **3**) mohou být oxidovány za vzniku produktů OP-T2 a OP-T3. Dále může probíhat konkurenční jednoelektronová oxidace za vzniku fenoxyl radikálu (**4**), který může dimerizovat [201] za tvorby produktů OP-T5 a OP-T6. Deprotonace hydroxyskupiny na aromatickém kruhu usnadňuje vznik fenoxyl radikálu a následně vznik dimerů, což koresponduje s nárůstem proudu píku A v alkalickém prostředí (Obr. 5.5).

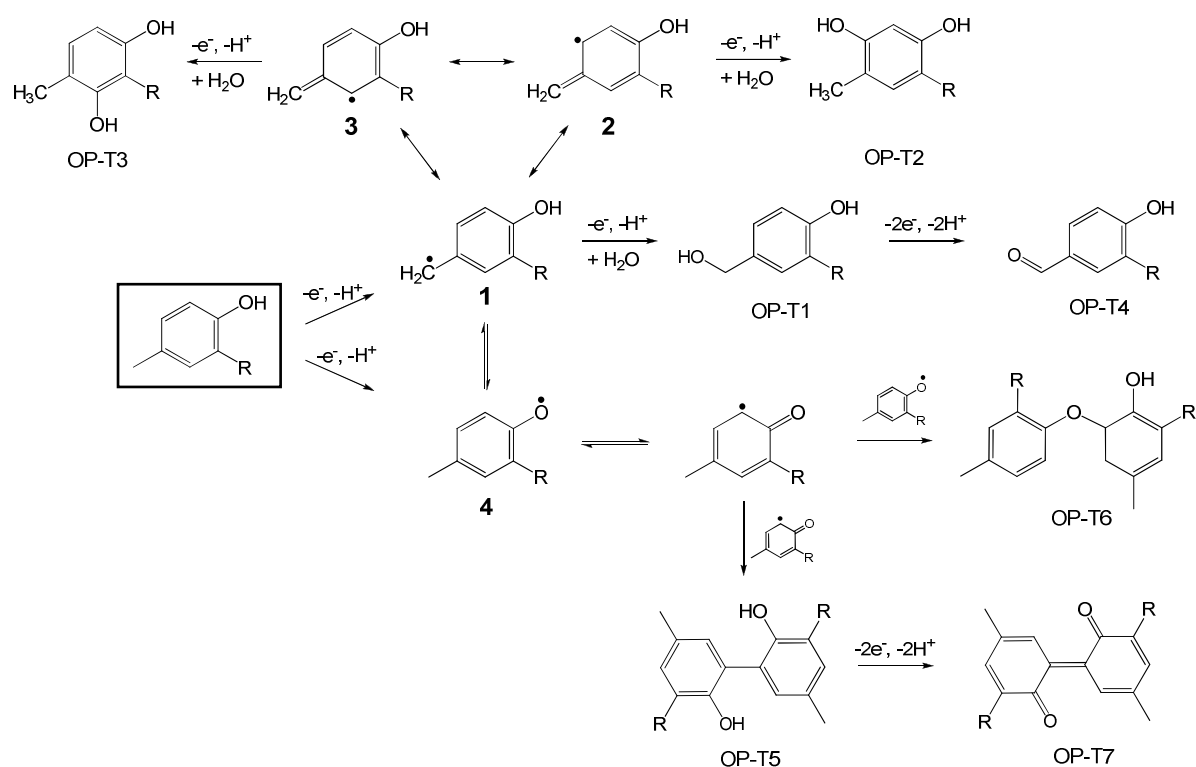
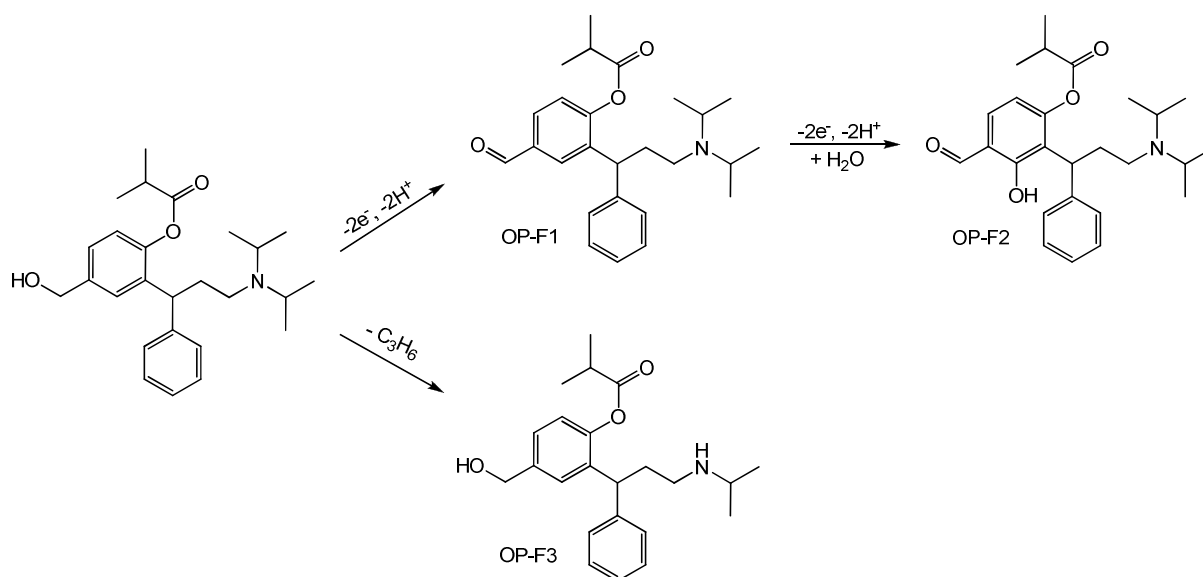


Schéma 8 Návrh mechanismu elektrochemické oxidace tolterodinu

V dalším reakčním kroku je OP-T1 oxidován na odpovídající aldehyd (OP-T4). Tato reakce je dobře zaznamatelná v kyselém prostředí, protože v neutrálním a alkalickém prostředí přednostně dochází ke vzniku fenoxyl radikálů a následně dimerů. Oxidací dimerů mohou vznikat oligomery nebo chinoidní struktury (OP-T7). Z tohoto důvodu byl zaznamenán nárůst píku C. Adsorpce dimerů/oligomerů a chinoidních produktů prokázané ve voltametričeských experimentech způsobují pokrytí elektrodového povrchu a znesnadňují elektrodové reakce.

#### 5.4.2. Mechanismus oxidace fesoterodinu

Navržený mechanismus oxidace fesoterodinu je znázorněn ve *Schématu 9*. Fesoterodin poskytoval ve voltametričeském záznamu jeden ireverzibilní oxidační signál, při kterém byl dehydrogenací přeměněn na jeho příslušný aldehyd (OP-F1). Tohoto produktu byl zaznamenán největší výtěžek a navíc s tímto tvrzením souhlasí i voltametričeské experimenty (Odd. 5.1.2), kdy má docházet k jednoelektronové reverzibilní elektrodové reakci za vzniku radikálu následované ireverzibilní chemickou reakcí. Této elektrochemické reakce se účastní stejný počet protonů a elektronů, jak ukazují  $E_p - \text{pH}$  závislosti. Oxidace substituovaných benzylalkoholů na příslušný benzaldehyd probíhá zřejmě ECEC mechanismem [202]. Produkt OP-F1 může dále podléhat hydroxylaci za vzniku produktu OP-F2. Samotný FES může během elektrolýzy podléhat oxidativní *N*-dealkylaci [193] na produkt OP-F3.

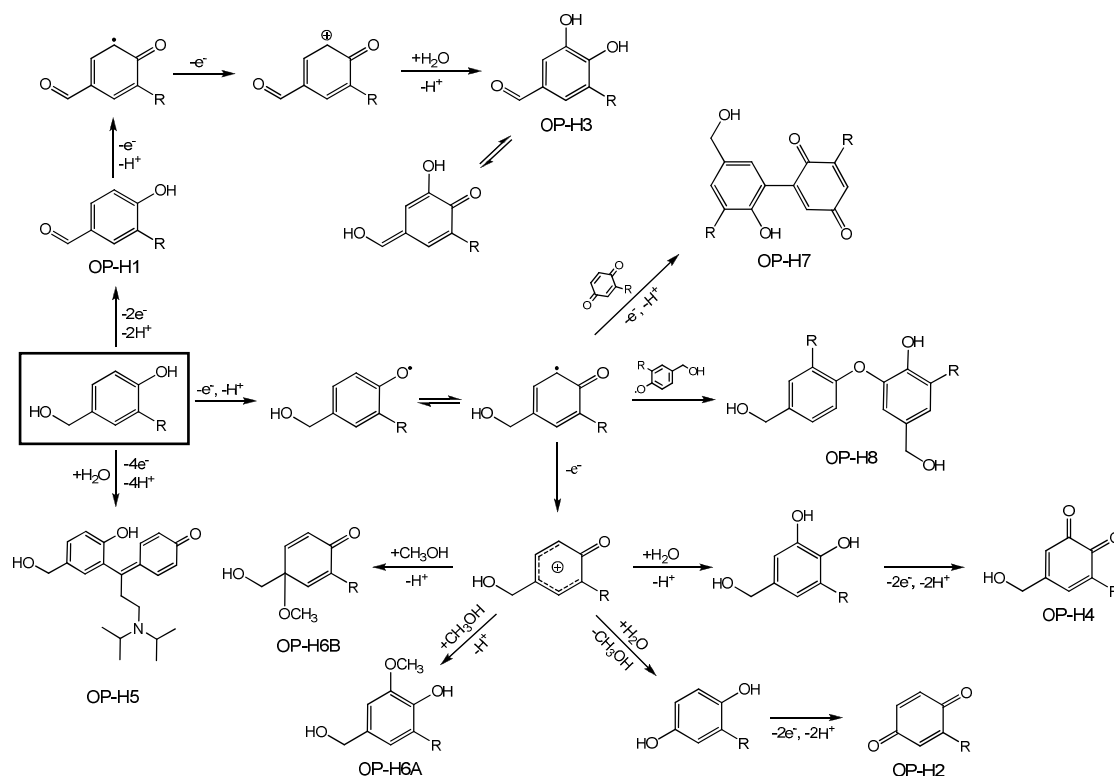


*Schéma 9* Návrh mechanismu elektrochemické oxidace fesoterodinu

### 5.4.3. Mechanismus oxidace 5-hydroxymethyltolterodinu

Navržený mechanismus oxidace 5-HMT je znázorněn ve *Schématu 10*. V prvním reakčním kroku (pík A) dochází k jednoelektronové oxidaci, která vede ke vzniku fenoxyl radikálu, který reaguje za vzniku dimerů (OP-H7, OP-H8). Fenoxyl radikál může podléhat další oxidaci za vzniku fenoxoniového kationtu a ten může být hydroxylován za vzniku odpovídajícího hydrochinonu, který je následně oxidován na příslušný *p*-benzochinon (OP-H2), jak bylo popsáno pro strukturně podobnou sloučeninu [203]. Přes fenoxoniový kationt může docházet také ke vzniku *o*-chinonu OP-H4.

V prvním kroku oxidace zároveň dochází k dehydrogenaci 5-HMT za vzniku aldehydické skupiny (OP-H1). Mechanismus této reakce byl také objasněn a popsán u strukturně podobné sloučeniny [202,203]. OP-H1 může být dále oxidován přes fenoxyl radikál na fenoxoniový kationt, který dále podléhá hydroxylaci za vzniku OP-H3 vyskytujícího se ve dvou tautomerních formách. Hydroxylace může být směřována také na nesubstituované benzenové jádro 5-HMT vznikem produktu OP-H5, jehož redukovaná forma vzniká metabolizací v těle krysy [204]. Oba aromatické kruhy se tak dostanou do vzájemné konjugace. Během elektrolýzy v prostředí 50 % CH<sub>3</sub>OH může také dojít k methoxylaci (OP-H6A a OP-H6B). V případě dimerů by bylo možné navrhnout další struktury, přičemž jednoznačné rozhodnutí by vyžadovalo izolaci látek a jejich strukturní analýzu.



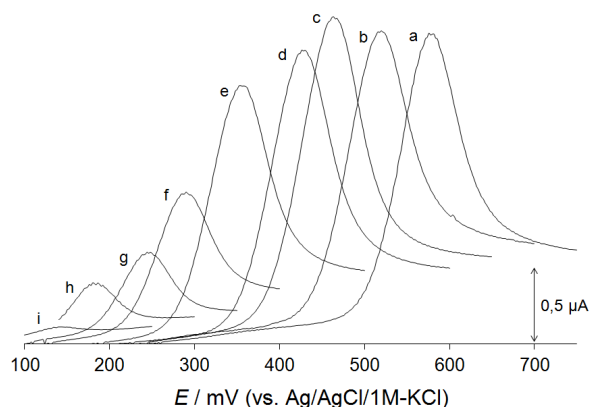
*Schéma 10 Návrh mechanismu elektrochemické oxidace 5-hydroxymethyltolterodinu*

## 5.5. Elektrochemické chování rutinu na uhlíkových pastových elektrodách

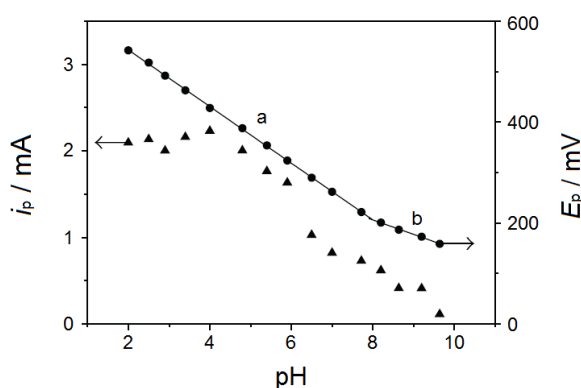
V této kapitole je popsáno elektrochemické chování a stanovení flavonolu rutinu voltametričnými a amperometričnými technikami na třech různých uhlíkových pastových elektrodách: nemodifikované (CPE), modifikované ftalocyaninem železnatým (IP/CPE) a CPE s iontovou kapalinou [hmin][Tf<sub>2</sub>N] jako pojivem (IL/CPE). Cílem bylo zjistit, jak modifikace CPE ovlivňuje redoxní přeměnu rutinu a jsou-li studované elektrody použitelné pro stanovení rutinu v reálném vzorku.

### 5.5.1. Voltametričké chování rutinu na uhlíkových pastových elektrodách

Jak již bylo popsáno v kapitole 2.5.5, oxidace rutinu se odehrává ve dvou po sobě jdoucích krocích. První redoxní přeměna je z pohledu analytické využitelnosti významnější, proto jsou nadcházející experimenty soustředěny na tento proces. První oxidační signál rutinu je kvazireverzibilní proces závislý na pH (Obr. 5.35).



Obr. 5.35. Lineární voltamogramy rutinu o koncentraci 0,1 mol/l v B-R pufrch o pH 2 (a), pH 3 (b), pH 4 (c), pH 5 (d), pH 6 (e), pH 7 (f), pH 8 (g), pH 9 (h) a pH 9,5 (i) měřené na CPE při rychlosti scanu 100 mV/s.

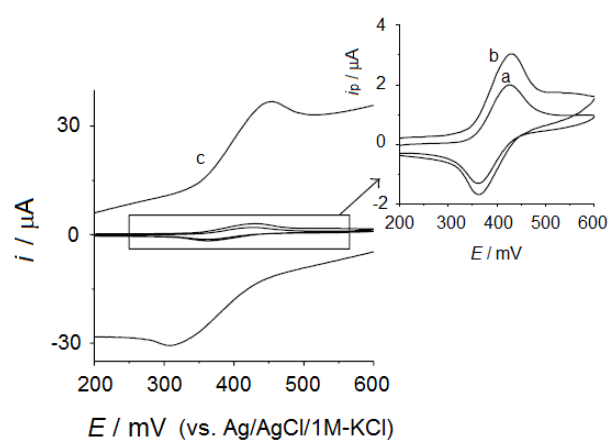


Obr. 5.36. Závislost proudové anodické odezvy rutinu ( $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ ) a jeho potenciálu na pH. Měřeno CV na CPE při rychlosti scanu 100 mV/s.

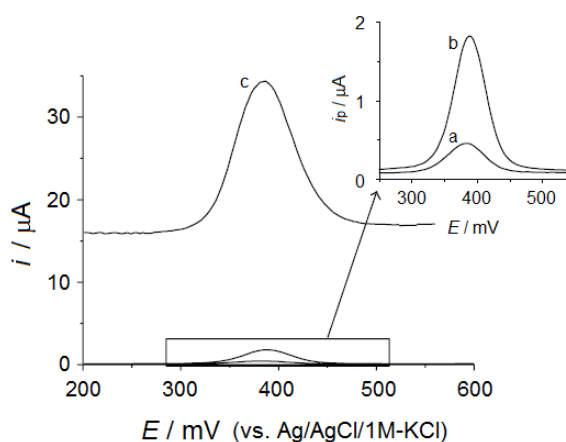
Závislost potenciálu píku rutinu na pH (Obr. 5.36) je tvořena dvěma lineárními úseky se směrnicemi  $-56 \text{ mV pH}^{-1}$  a  $-29 \text{ mV pH}^{-1}$ . Za předpokladu, že v prvním stupni oxidace rutinu se odštěpují dva elektrony, odpovídá vyšší hodnota směrnice zjištěná pro kyselé a neutrální prostředí ztrátě dvou protonů a nižší hodnota, zjištěná pro alkalické roztoky, ztrátě jednoho protonu. Průsečík obou přímkových úseků při pH 8,0 by mohl odpovídat zdánlivé disociační konstantě rutinu. Spektrofotometričticky byla určena hodnota  $pK = 7,14$  [111], v literatuře je publikována hodnota  $pK = 7,1$  [205]. Proud píku rutinu je nejintenzivnější v kyselém

prostředí (pH < 5), s rostoucím pH klesá a při pH > 10 už není pozorovatelný. Pro další experimenty bylo použito pH = 4, při němž rutin poskytuje nejvyšší odezvu (Obr. 5.36) [111,206].

Předběžné experimenty pro srovnání třech připravených CPEs zahrnovaly srovnání jejich použitelného potenciálového rozsahu a proudového pozadí. Nejširší použitelný potenciálový rozsah měla elektroda IL/CPE (2,5 V), ve srovnání s CPE (1,5 V) a IP/CPE (1,3 V), a zároveň vykazovala i nejvyšší proudové pozadí (asi 60x vyšší než CPE a IP/CPE). Vysoké proudové pozadí je typické pro elektrody s iontovou kapalinou jako pojivem [106,207].



Obr. 5.37. Cyklické voltamogramy rutinu na IP/CPE (a), CPE (b) a IL/CPE (c) naměřené v roztoku rutinu o koncentraci 0,1 mmol/l v octanovém pufru pH = 4,0 při rychlosti scanu 100 mV/s.



Obr. 5.38. Diferenční pulzní voltamogramy rutinu na IP/CPE (a), CPE (b) a IL/CPE (c) naměřené v roztoku rutinu o koncentraci 8 µmol/l v octanovém pufru pH = 4,0 při rychlosti scanu 20 mV/s, s pulzní amplitudou 0,05 V a šířkou pulzu 0,1 s.

Všechny tři studované elektrody dávaly cyklické voltamogramy rutinu s kvazireverzibilní dvojicí píků (Obr. 5.37), jejichž parametry jsou uvedeny v *Tabulce 9*. Nejvyšší poměr proudu katodického a anodického píku, který značí lepší reverzibilitu redoxní reakce rutinu, měla mezi testovanými elektrodami IP/CPE. Z toho vyplývá, že fitalocyanin železnatý katalyzuje oxidaci rutinu podobně jako u jiných fenolů a polyfenolů [208,209].

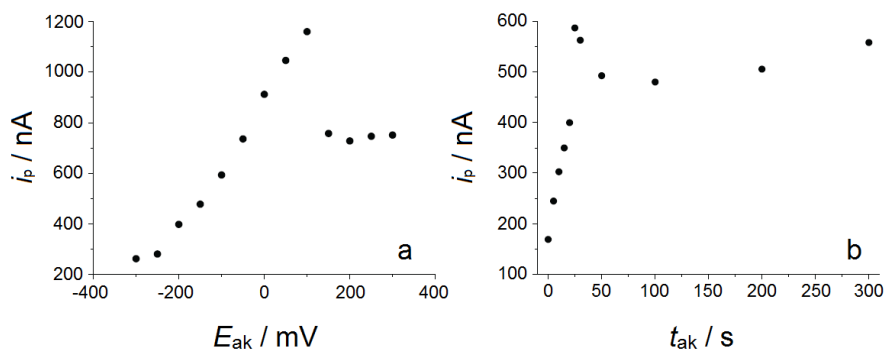
*Tabulka 9 Parametry CV píku rutinu (c = 0,1 mmol/l) na třech studovaných uhlíkových pastových elektrodách.*

Elektroda	$E_{pa}$ (mV)	$E_{pc}$ (mV)	$\Delta E_p$ (mV)	$i_a \pm s_a$ (µA)	$i_c/i_a$
CPE	429	363	66	$2,2 \pm 0,02$	0,65
IP/CPE	427	367	60	$1,6 \pm 0,02$	0,76
IL/CPE	450	318	132	$21,5 \pm 0,32$	0,66

$E_{pa}$  – potenciál anodického píku,  $E_{pc}$  – potenciál katodického píku (vs. Ag/AgCl, 1M-KCl),  $\Delta E_p$  – rozdíl potenciálů anodického a katodického píku,  $i_a$  – proud anodického píku (průměr ze sedmi opakovaných měření se směrodatnou odchylkou –  $s_a$ ),  $i_c/i_a$  – podíl katodického a anodického proudu píku.

Proud píku rutinu byl téměř desetkrát vyšší u IL/CPE než u CPE. Nicméně větší rozdíl potenciálů katodického a anodického píku  $\Delta E_p$  u IL/CPE (dvojnásobný oproti CPE) a srovnatelný poměr  $i_c/i_a$  (Tabulka 9) značí, že vyšší proud píku není způsoben elektrokatalytickým efektem iontové kapaliny, ale spíše větší elektroaktivní plochou elektrody. Toto tvrzení podporuje také vysoké proudové pozadí IL/CPE ve srovnání s CPE. Stejně jako u CV, také diferenční pulzní voltametrií byla zaznamenána nejvyšší proudová odezva rutinu na elektrodě IL/CPE (Obr. 5.38).

Byla pozorována silná adsorpce rutinu na všech třech studovaných elektrodách. Nejdříve byla studována samovolná adsorpce rutinu tak, že elektrody byly ponořeny na 5 min do roztoku rutinu o koncentraci 2  $\mu\text{mol/l}$ , poté byly vyjmuty z roztoku, opláchnuty destilovanou vodou a vloženy do elektrochemické cely se základním elektrolytem. Signál rutinu byl pozorován u všech tří elektrod. Výška píku, ve srovnání s výškou píku zaznamenaného v roztoku rutinu o koncentraci 2  $\mu\text{mol/l}$ , odpovídala 77 % pro CPE, 64 % pro IL/CPE a 50 % pro IP/CPE. Po obnovení povrchu elektrod už nebyla v základním elektrolytu pozorována žádná odezva, což vylučuje kontaminaci základního elektrolytu a také difúzi roztoku rutinu do hloubky elektrodového materiálu.



Obr. 5.39. Závislosti proudové výšky DPV píku rutinu o koncentraci 2  $\mu\text{mol/l}$  v octanovém pufru (pH = 4) na potenciálu akumulace při čase akumulace  $t_{ak} = 25$  s (a) a na čase akumulace při potenciálu akumulace  $E_{ak} = +0,1$  V (b). CPE, rychlost scanu 20 mV/s, pulzní amplituda 0,05 V a šířka pulzu 0,1 s.

Dále byla sledována závislost odezvy rutinu na potenciálu a čase akumulace pomocí DPAdSV. Akumulace v roztoku rutinu o koncentraci 2  $\mu\text{mol/l}$  byla nejúčinnější při potenciálu akumulace +0,1 V a čase akumulace 25 s (Obr. 5.39). Pro všechny tři elektrody byly zjištěny podobné závislosti. Z experimentů vyplývá, že rutin se velmi dobře adsorbuje na povrchu uhlíkových pastových elektrod a jeho adsorpce je podpořena vloženým potenciálem. Silná adsorpce rutinu tak může být využita pro zvýšení citlivosti stanovení rutinu pomocí jeho akumulace na elektrodový povrch.



### 5.5.2. Voltametrické stanovení rutinu na uhlíkových pastových elektrodách

Kalibrační závislosti rutinu byly měřeny metodami DPV a DPAdSV se všemi třemi studovanými elektrodami. Obě metody poskytovaly lineární kalibrační závislosti pro oblast mikromolárních koncentrací. U DPAdSV bylo dosaženo nižších mezí detekce, ale také užšího lineárního koncentračního rozsahu. Akumulace měla největší vliv na zvýšení signálu rutinu u elektrody IL/CPE, kde bylo dosaženo meze detekce 5 nmol/l (Tabulka 10).

Tabulka 10 Parametry regresních kalibračních přímk rutinu, meze detekce a stanovitelnosti na studovaných uhlíkových pastových elektrodách metodou DPV a DPAdSV

Metoda	Elektroda	LOD ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	$a \pm s_a$ (nA l $\mu\text{mol}^{-1}$ )	$b \pm s_b$ (nA)	$R^2$	c ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )
DPV	CPE	0,2	0,7	$2 \cdot 10^9 \pm 8 \cdot 10^7$	$-41,9 \pm 28,9$	0,9911	0,2 – 8
	IP/CPE	0,08	0,3	$8 \cdot 10^7 \pm 2 \cdot 10^6$	$19,4 \pm 6,0$	0,9985	0,08 – 6
	IL/CPE	0,6	2,0	$8 \cdot 10^7 \pm 4 \cdot 10^6$	$21,1 \pm 12,4$	0,9920	0,6 – 6
DPAdSV	CPE	0,01	0,03	$5 \cdot 10^8 \pm 3 \cdot 10^7$	$-2,15 \pm 2,05$	0,9784	0,01 – 0,1
	IP/CPE	0,02	0,06	$9 \cdot 10^8 \pm 6 \cdot 10^7$	$-171 \pm 38$	0,9886	0,2 – 1
	IL/CPE	0,005	0,02	$8 \cdot 10^8 \pm 3 \cdot 10^7$	$-13,5 \pm 7,3$	0,9935	0,02 – 0,6
	IL/CPE			$5 \cdot 10^9 \pm 2 \cdot 10^8$	$172 \pm 68$	0,9852	0,005 – 0,8

LOD – odhad meze detekce, LOQ – odhad meze stanovitelnosti,  $a$  – směrnice kalibrační závislosti,  $b$  – úsek kalibrační přímky,  $R^2$  – koeficient determinace,  $s$  – směrodatná odchylka,  $c$  – lineární koncentrační rozsah

Pro stanovení rutinu v modelovém vzorku byla použita metoda standardního přídatku. Stanovení bylo provedeno DPV a DPAdSV se třemi přídatky standardu rutinu. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 11. Všechna stanovení byla přesná a správná se spolehlivostí 95 %.

Tabulka 11 Stanovení rutinu v modelovém vzorku použitím metody standardního přídatku, počet opakovaných měření  $n = 5$

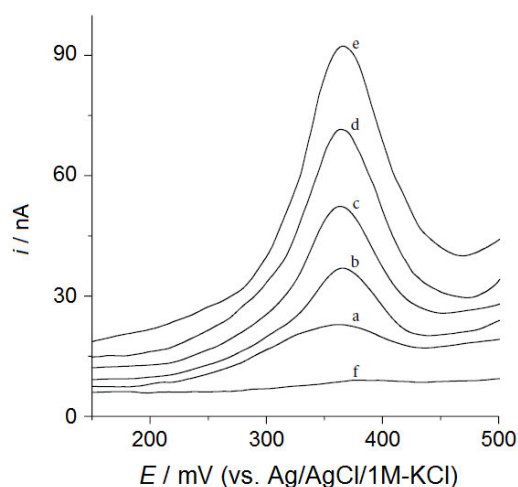
Metoda	Elektroda	$\xi$ ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	$\bar{x}$ ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	$s_r$ (%)	Bias (%)
DPV	CPE	2,00	1,99	2,6	-0,74
		0,40	0,42	4,3	5,06
	IP/CPE	2,00	2,01	4,7	0,31
		0,40	0,40	4,5	0,98
	IL/CPE	2,00	2,07	6,3	3,58
		0,40	0,43	7,1	7,22
DPAdSV	CPE	0,06	0,057	4,9	-5,53
		0,40	0,39	3,6	-2,85
	IP/CPE	0,06	0,063	5,4	4,50
		0,40	0,41	5,1	1,51
	IL/CPE	0,06	0,064	9,1	7,27
		0,40	0,42	6,8	4,10

$s_r$  – relativní směrodatná odchylka,  $\xi$  - Pravá hodnota koncentrace rutinu,  $\bar{x}$  – Aritmetický průměr opakovaných naměřených hodnot koncentrace rutinu

Srovnávací měření bylo provedeno pomocí HPLC/UV-Vis s roztokem rutinu o koncentraci 2  $\mu\text{mol/l}$ . Pro pět opakování byla u HPLC/UV-Vis zjištěna relativní směrodatná odchylka  $s_r = 4,3 \%$  a vychýlení měření (bias) 3,5 %, což je srovnatelné s hodnotami získanými voltametrickým měřením (Tabulka 11). Nejnižší hodnoty směrodatné odchylky

( $s_r < 5\%$ ) byly pro obě techniky pozorovány u CPE a nejnižší hodnoty bias ( $< 5\%$ ) byly zjištěny u IP/CPE. Naopak, největší směrodatná odchylka a vychýlení měření byly pozorovány u elektrody IL/CPE.

Voltametrické stanovení rutinu bylo testováno na reálném vzorku semen pohanky seté (*Fagopyrum esculentum moench.*). Pro extrakci rutinu byly použity čtyři extrakční postupy: extrakce varem (BWE), Soxhletova extrakce (SE), vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (PSE) a superkritická fluidní extrakce (SFE). Cílem bylo nalézt nejvhodnější metodu pro izolaci rutinu z pohankových semen. Pro voltametrické stanovení byla použita DPV bez akumulace.



Obr. 5.40. Diferenční pulzní voltamogramy desetkrát ředěného BWE extraktu z pohankových semen (a) a čtyři standardní přídávky roztoku rutinu: 20 nmol (b), 40 nmol (c), 60 nmol (d) a 80 nmol (e) v octanovém pufru pH = 4 jako základním elektrolytu (f) na IP/CPE.

Extrakty získané metodou SFE neposkytly žádný elektrochemický signál rutinu. Použité rozpouštědlo, oxid uhličitý, je zřejmě nevhodný pro extrakci tohoto polárního analytu. Ve vzorcích PSE extraktů byla zaznamenána odezva při 0,1 V, což je nižší potenciál než poskytuje rutin. Tento signál odpovídá nejpravděpodobněji oxidaci kvercetin, jak bylo zjištěno přidávkou standardního roztoku kvercetin do měřeného vzorku PSE extraktu. Přítomnost kvercetin místo rutinu může být vysvětlena buď hydrolyzou rutinu na jeho aglykon, kvercetin, nebo, což je více pravděpodobné, přednostní extrakcí méně polárního kvercetin do méně polárního rozpouštědla (acetonu). V extraktu získaném metodou SE byl rutin detegován, ale jeho signál se překrýval se signálem kvercetin, což znemožnilo rutin v tomto extraktu stanovit. V extraktu získaném metodou BWE byl detegován pouze rutin, neboť méně polární kvercetin je ve vodě hůře rozpustný. V tomto extraktu mohl být rutin stanoven. Výsledky stanovení obsahu rutinu v BWE extraktu metodou standardního přídávku (Obr. 5.40) jsou shrnuty v *Tabulce 12*.

*Tabulka 12 Zjištěné hodnoty obsahu rutinu vyjádřené v mg/100 g sušených pohankových semen*

<b>Elektroda</b>	<b><i>x</i> (mg/100 g)</b>	<b><i>s</i> (mg/100 g)</b>
CPE	11,8	0,8
IP/CPE	12,3	2,1
IL/CPE	11,0	0,6
HPLC/UV-Vis	11,4	0,1

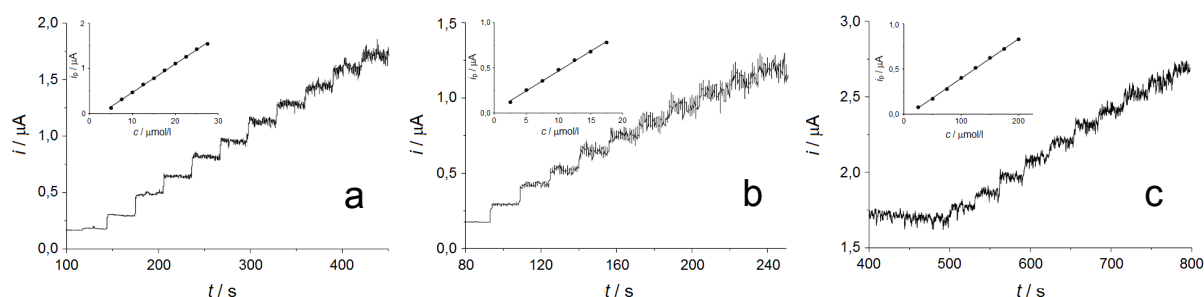
*s* – směrodatná odchylka

Referenční metodou HPLC/UV-Vis byl stanoven srovnatelný obsah rutinu v extraktu získaném metodou BWE. Tyto výsledky korespondují s obsahem rutinu v pohankových semenech uvedenými v literatuře (13,6 mg/100 g) [210]. Všechny tři elektrody jsou tedy použitelné pro stanovení rutinu v modelovém vzorku i reálném vzorku pohanky, kde však velmi záleží na volbě extrakčního postupu a zejména rozpouštědla.

### 5.5.3. Amperometrické stanovení rutinu na uhlíkových pastových elektrodách

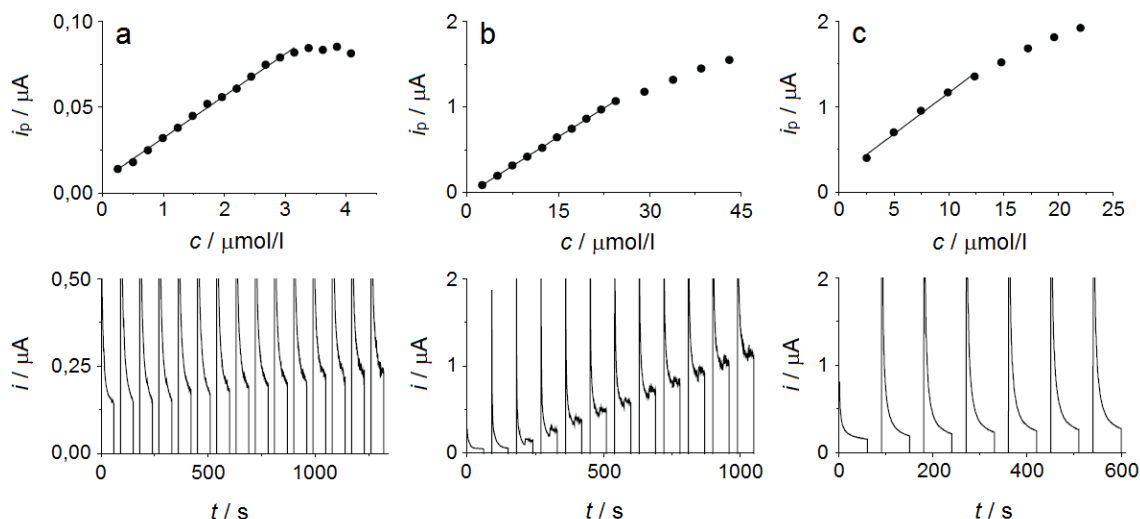
Kromě voltametrických technik byla pro stanovení rutinu na uhlíkových pastových elektrodách zvolena také amperometrie. Vedle klasického použití ve volumetrii a coulometrii při detekci bodu ekvivalence (amperometrické a biamperometrické titrace), má tato metoda velký význam také v oblasti analýzy látek v toku kapaliny (kontinuální analyzátoři, detekce v separačních metodách). Speciální konstrukce amperometrických cel jsou používány jako detektory látek v proudících kapalinách a nalézají široké praktické uplatnění rovněž při detekci plynných látek v plynném či kapalném prostředí, například Clarkův senzor pro stanovení plynů v komplikovaných maticích jako jsou biologické tekutiny [211].

Amperometrické měření rutinu bylo prováděno v míchaném roztoku v tříelektrodevém elektrochemickém článku s pracovními uhlíkovými pastovými elektrodami, použitými k výše popsaným voltametrickým experimentům. Po opakovaných nástřicích standardního roztoku rutinu docházelo u všech tří testovaných elektrod ke zvyšování šumu (Obr. 5.41), což mohlo být způsobeno adsorpcí rutinu nebo jeho oxidačních produktů na povrch elektrody. U elektrody modifikované iontovou kapalinou byl šum pozorován už při nízkých koncentracích rutinu (5  $\mu\text{mol/l}$ ), což znesnadňovalo vyhodnocování amperogramu.



Obr. 5.41. Amperogramy a odpovídající kalibrační závislosti rutinu na CPE (a), IP/CPE (b) a IL/CPE (c) při potenciálu 500 mV.

Byla snaha vyvinout metodu, která by potlačila nežádoucí šum. Použitím pulzní techniky zahrnující čistící krok při -300 mV po dobu 30 s (Obr. 5.42) došlo k významnému zlepšení poměru signál/šum. U pulzní techniky bylo také dosaženo nižších hodnot mezi detekce a stanovitelnosti. Nejnižší hodnoty LOD a LOQ byly zjištěny u nemodifikované CPE. Zvyšování koncentrace mělo za následek nelinearitu kalibrační závislosti (Obr. 5.42) v důsledku adsorpce rutinu nebo jeho produktů na povrch elektrody. U nemodifikované CPE byl zároveň zaznamenán nejširší lineární koncentrační rozsah rutinu za použití pulzní amperometrické techniky (Tabulka 13).



Obr. 5.42. Pulzní amperogramy (proudy zahrnující čistící pulzy byly pro přehlednost z amperogramů odebrány) a odpovídající kalibrační křivky rutinu na CPE (a), IP/CPE (b) a IL/CPE (c). Potenciál byl nastaven na +600 mV na 60 s, následoval čistící krok při -300 mV, během kterého byl do měrné cely nadávkován alikvotní podíl roztoku rutinu.

Tabulka 13 Parametry regresních kalibračních přímek rutinu na uhlíkových pastových elektrodách získané z amperometrických měření

Metoda	Elektroda	LOD ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	$a \pm s_a$ ( $\text{nA l mmol}^{-1}$ )	$b \pm s_b$ (nA)	$R^2$	$c$ ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )
Amperometrie	CPE	1,31	1,94	$63,1 \pm 0,8$	$-0,16 \pm 0,01$	0,9987	5,0 – 27,5
	IP/CPE	1,60	2,33	$41,9 \pm 0,9$	$0,04 \pm 0,01$	0,9985	2,5 – 22,5
	IL/CPE	8,77	12,95	$4,4 \pm 0,1$	$-0,04 \pm 0,01$	0,9991	25,0 – 200
Pulzní amperometrie	CPE	0,20	0,29	$24,6 \pm 0,4$	$0,01 \pm 0,01$	0,9967	0,25 – 3,15
	IP/CPE	0,50	0,75	$45,0 \pm 0,3$	$-0,02 \pm 0,01$	0,9997	2,5 – 24,3
	IL/CPE	3,05	4,20	$96,4 \pm 5,1$	$0,20 \pm 0,04$	0,9891	2,5 – 12,3

LOD – odhad meze detekce, LOQ – odhad meze stanovitelnosti,  $a$  – směrnice kalibrační závislosti,  $b$  – úsek kalibrační přímky,  $R^2$  – koeficient determinace,  $s$  – směrodatná odchylka,  $c$  – lineární koncentrační rozsah

Byla vyvinuta pulzní amperometrická metoda výrazně potlačující šum způsobený adsorpcí rutinu nebo jeho oxidačních produktů na povrch všech studovaných uhlíkových pastových elektrod. U bezpulzní metody byla nejcitlivější detekce s CPE, čemuž odpovídá i největší směrnice kalibrační závislosti. U pulzní amperometrie byla podle směrnice kalibrační přímky nejcitlivější detekce na IL/CPE, mez detekce však byla nejnižší u CPE.

## 6. Závěr

Elektrochemické chování dvou antimuskarinových léčiv, tolterodinu a fesoterodinu, a jejich společného aktivního metabolitu 5-hydroxymethyltolterodinu bylo sledováno třemi různými elektrochemickými technikami (CV, DPV, SWV). Nejdříve byla provedena voltametrická měření, dále byly látky separovány za použití HPLC s elektrochemickou detekcí s borem dopovanou diamantovou elektrodou a všechny tři látky byly také elektrolyzovány v různých prostředích s použitím coulometrie za konstantního potenciálu s následnou UPLC/ESI-MS analýzou oxidačních produktů. Také bylo studováno elektrochemické chování rutinu voltametrickými a amperometrickými technikami na uhlíkových pastových elektrodách.

Elektrochemické chování studovaných látek je silně závislé na pH. Z voltametrických analýz byly zjištěny dva ireverzibilní oxidační stupně tolterodinu, přičemž při  $\text{pH} \geq 6$  se objevoval třetí anodický signál. FES poskytoval pouze jeden ireverzibilní oxidační pík. V alkalickém prostředí však docházelo k samovolné hydrolyze FES na 5-HMT. V záznamu cyklické voltametrie 5-HMT byly v anodické části patrné dva oxidační signály a v katodické oblasti jim odpovídající dva redukční píky.

Byla vyvinuta metoda chromatografické separace TOL, FES a 5-HMT technikou HPLC s elektrochemickou detekcí. Jako elektrochemické čidlo byla zvolena borem dopovaná diamantová elektroda. Pro izokratický mód se jako mobilní fáze nejlépe osvědčila směs acetonitril/fosfátový pufr pH 7 o koncentraci 0,05 mol/l v poměru 30:70 (v/v). Ze čtyř testovaných kolon bylo nejpříznivějších výsledků dosaženo na koloně Nucleodur® CN-RP 3  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  2 mm I. D., protože nejlépe potlačila rozdíly v polaritě studovaných látek při zachování požadovaného rozlišení analytů. Odhady mezi detekce se pohybovaly v jednotkách nmol/l. Tato metoda se může stát součástí postupu vhodného ke stanovení studovaných látek v moči nebo plazmě.

Za použití coulometrie za konstantního potenciálu byly TOL, FES a 5-HMT elektrochemicky oxidovány a produkty elektrolýzy byly následně analyzovány metodou UPLC/ESI-MS. Elektrolýza TOL vedla především ke vzniku hydroxyderivátů a dimerů. FES byl elektrolyzován za vzniku příslušného aldehydu. Elektrolýzou 5-HMT vznikalo největší množství produktů, což je v souladu s jeho složitějším voltametrickým chováním. Jednalo se o produkty vzniklé dehydrogenací, hydroxylací, methoxylací nebo dimerizací. Mezi produkty elektrochemické oxidace studovaných antimuskarinik byly nalezeny i látky vznikající

metabolickou cestou v živých organismech. Elektrolýzou tolterodinu vznikl produkt OP-T1, jehož struktura odpovídá 5-HMT, hlavnímu metabolitu TOL v lidském těle i v tělech pokusných zvířat [115,208]. Elektrolýzou 5-HMT byl získán produkt OP-H5, jehož redukovaná forma vzniká metabolizací v těle krys [208].

Bylo studováno elektrochemické chování rutinu na třech CPEs: nemodifikované (CPE), modifikované ftalocyaninem železnatým (IP/CPE) a s iontovou kapalinou [hmin][Tf<sub>2</sub>N] jako pojivem (IL/CPE). Bylo zjištěno, že modifikátor ftalocyanin železnatý má elektrokatalytický účinek na oxidaci rutinu. Iontová kapalina zvyšovala proudovou odezvu rutinu se současným zvýšením proudového pozadí, což je zřejmě způsobeno zvětšením elektroaktivní plochy elektrody. Rutin je silně adsorbován na povrch všech studovaných pracovních elektrod, což bylo využito ke zvýšení citlivosti použitím metody DPAdSV. S touto technikou tak bylo na IL/CPE dosaženo meze detekce 5 nmol/l. CPEs při amperometrických měřeních za konstantního potenciálu vykazovaly velký šum. Pro jeho potlačení byla navržena pulzní amperometrická metoda zahrnující čistící krok při -300 mV po dobu 30 s, se kterou bylo navíc dosaženo nižších LOD. Všechny testované CPEs jsou použitelné pro analýzu rutinu v reálných vzorcích, jak bylo prokázáno na analýze extraktů ze semen pohanky seté.

## Seznam symbolů a zkratek

5-HMT	5-hydroxymethyltolterodin
$\alpha$	Koeficient přenosu náboje
$A$	Aktivní plocha elektrody
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
AU	Absorbanční jednotka
BDD	Borem dopovaná diamantová elektroda
BER	Berberin
B-R pufr	Britton-Robinsonův pufr
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
BWE	Extrakce varem ve vodě (z angl. „Boiling Water Extraction”)
CE	Kapilární elektroforéza
CNTPE	Uhlíková pastová elektroda s mnohostěnnými uhlíkovými nanotrubičkami (z angl. „Multi-Wall Carbon-Nanotube Paste Electrode“)
CPE	Uhlíková pastová elektroda (nemodifikovaná)
CPEs	Uhlíkové pastové elektrody
CV	Cyklická voltametrie
$D$	Difúzní koeficient
DESI	Desorpční ionizace elektrosprejem
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNA/CPE	Uhlíková pastová elektroda modifikovaná deoxyribonukleovou kyselinou
DPAdSV	Diferenční pulzní adsorptivní rozpouštěcí voltametrie (z angl. „Differential Pulse Adsorptive Stripping Voltammetry“)
DPV	Diferenční pulzní voltametrie
$E^{\circ}$	Standardní redox potenciál
$E_{ak}$	Potenciál akumulace
$E_f$	Konečný potenciál („final“)
$E_i$	Počáteční potenciál („initial“)
$E_i$	Ireverzibilní elektrodová reakce



$E_{p,a}$	Potenciál anodického píku
$E_{p,k}$	Potenciál katodického píku
$E_r$	Reverzibilní elektrodová reakce
$E_S$	Přepínací potenciál („switching“)
EC/LC/MS	Spojení elektrochemie s kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí
EC/MS	Spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií
EC/NMR	Spojení elektrochemie s nukleární magnetickou rezonancí
EI	Elektronová ionizace
ESI	Ionizace elektrosprejem
ESI-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem
FAB	Bombardování rychlými atomy
FePc	Ftalocyaninové komplexy železa
FES	Fesoterodin
FTIR	Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
GC	Plynová chromatografie
GC/MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GCE	Elektroda ze skelného uhlíku
[hmim][Tf <sub>2</sub> N]	Iontová kapalina 1-hexyl-3-methylimidazolium-bis(trifluoromethylsulfonyl)imid
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
$i_{p,a}$	Proud anodického píku
$i_{p,k}$	Proud katodického píku
I. D.	Vnitřní průměr (z angl. „Internal Diameter“)
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IL	Iontová kapalina
IL/CPE	Uhlíková pastová elektroda s iontovou kapalinou jako pojivem
IP	Ftalocyanin železnatý
IP/CPE	Uhlíková pastová elektroda modifikovaná ftalocyaninem železnatým
IS	Vnitřní standard (z angl. „Internal Standard“)
$k$	Retenční faktor

$k_{\text{chem}}$	Chemická rychlostní konstanta
$k_r$	Rychlostní konstanta
$k^\circ$	Standardní rychlostní konstanta
LC/MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
LSV	Lineární voltametrie (z angl. „Linear Sweep Voltammetry“)
$[M + H]^+$	Protonovaná molekula
MALDI	Laserová desorpce/ionizace za účasti matrice (z angl. „Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization“)
MIP-MWNPE	Uhlíková pastová elektroda s molekulárně tištěným polymerem a mnohostěnnými uhlíkovými nanotrubičkami (z angl. „Molecularly Imprinted Polymer-Multiwall Carbon Nanotube Paste Electrode“)
MPc	Ftalocyaninové komplexy kovů (z angl. „Metal Phthalocyanines“)
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
$v$	Rychlost scanu
NMR	Nukleární magnetická resonance
OP-F	Oxidační produkt fesoterodinu
OP-H	Oxidační produkt 5-hydroxymethyltolterodinu
OP-T	Oxidační produkt tolterodinu
PB	Ionizace svazkem částic (z angl. „Particle Beam“)
Pd/H <sub>2</sub>	Hydrogen-palladiová referentní elektroda
PDA	Detektor diodového pole (z angl. „Photo Diode Array“)
$pK_a$	Disociační konstanta (- log $K$ )
PSE	Akcelerovaná extrakce (z angl. „Pressurized Solvent Extraction“)
QqQ	Trojité kvadrupól
Q-TOF	Hybridní kvadrupólový průletový analyzátor
$R$	Molární plynová konstanta
$R^2$	Koeficient determinace
$R_n$	Rozlišení
RP	Reverzní fáze

$s$	Směrodatná odchylka
$s_r$	Relativní směrodatná odchylka
SCE	Nasyčená kalomelová referenční elektroda
SE	Soxhletova extrakce
SERS	Povrchem zesílený Ramanův rozptyl
SFE	Nadkritická fluidní extrakce (z angl. „Supercritical Fluid Extraction”)
SWV	Square-wave voltametrie
$T$	Absolutní teplota
$t_{ak}$	Čas akumulace
$t_R$	Retenční čas
$t_R'$	Redukovaný retenční čas
TOF	Průletový analyzátor (z angl. „Time of Flight“)
TOL	Tolterodin
TSP-MS	Hmotnostní spektrometrie s termosprejem
UPLC	Ultraúčinná kapalinová chromatografie
UPLC/MS	Ultraúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
UUI	Urgentní inkontinence (z angl. „Urinary Urge Incontinence“)
UV-Vis	Spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra
ZE	Základní elektrolyt

# Literatura

1. Heyrovský J.: *Elektrolýza se rtuťovou kapkovou kathodou*. Chem listy pro vědu a průmysl 16, 256-264 (1922).
2. West P. W., Dean J. F.: *Polarographic Determination of Nickel in Steel and Nickel Ore*. Ind Eng Chem 17, 686-688 (1945).
3. Milner G. W. C.: *Polarographic Determination of Lead in Brasses and Bronzes*. Analyst 70, 250-253 (1945).
4. Kolthoff I. M., Matsuyama G.: *Polarographic Analysis of Aluminum Alloys*. Ind Eng Chem 17, 615-620 (1945).
5. Muller O. H., Davis J. S.: *Polarographic Studies of Proteins and Their Degradation Products .1. The Protein Index*. Journal of Biological Chemistry 159, 667-679 (1945).
6. Gillam W. S.: *Polarographic Determination of Vitamin-C in Fruits and Vegetables*. Ind Eng Chem 17, 217-221 (1945).
7. Kirkpatrick H. F. W.: *A Polarographic Study of Alkaloids .1*. Quarterly Journal of Pharmacy and Pharmacology 18, 245-251 (1945).
8. Kirkpatrick H. F. W.: *A Polarographic Study of Alkaloids .2*. Quarterly Journal of Pharmacy and Pharmacology 18, 338-350 (1945).
9. Barnett J., Morris C. J. O. R.: *The Polarographic Estimation of Steroid Hormones 1. The Estimation of 17-Ketosteroids in Urinary Extracts*. Biochem J 39, R66-R66 (1945).
10. Barnett J., Morris C. J. O. R.: *The Polarographic Estimation of Steroid Hormones 2. Polarography of Related Steroid Hydrazones*. Biochem J 39, R67-R67 (1945).
11. Heath J. C.: *Polarographic Behaviour of Adenine*. Nature 158, 23-23 (1946).
12. Permentier H. P., Bruins A. P., Bischoff R.: *Electrochemistry-mass Spectrometry in drug metabolism and protein research*. Mini-Rev Med Chem 8, 46-56 (2008).
13. Lores E. M., Bristol D. W., Moseman R. F.: *Determination of Halogenated Anilines and Related Compounds by Hplc with Electrochemical and UV Detection*. J Chromatogr Sci 16, 358-362 (1978).
14. Mefford I., Adams R. N.: *Determination of Reduced Glutathione in Guinea-Pig and Rat Tissue by Hplc with Electrochemical Detection*. Life Sci 23, 1167-1173 (1978).

15. Mason W. D., Amick E. N., Heft W.: *Analysis of Ascorbic-Acid in Human-Plasma and Urine by Hplc with Electrochemical Detection*. Anal Lett Pt B 13, 817-824 (1980).
16. Usui T., Watanabe T., Higuchi S.: *Determination of a New Bisphosphonate, Ym175, in Plasma, Urine and Bone by High-Performance Liquid-Chromatography with Electrochemical Detection*. J Chromatogr-Biomed 584, 213-220 (1992).
17. Kusu F., Li X. D., Takamura K.: *Determination of Synephrine and N-Methyltyramine in Zhishi and Zhike (Immature Citrus-Fruits) by High-Performance Liquid-Chromatography with Electrochemical Detection*. Chem Pharm Bull 40, 3284-3286 (1992).
18. Jagota N. K., Stewart J. T.: *Determination of Mefenamic-Acid in Human Serum Using Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid-Chromatography Electrochemical-Detection*. Lc Gc-Mag Sep Sci 10, 688-& (1992).
19. Betto P., Ricciarello G., Pichini S., Strologo L. D., Rizzoni G.: *High-Performance Liquid-Chromatography Electrochemical Detection of 3-Methylhistidine in Human Urine*. J Chromatogr-Biomed 584, 256-260 (1992).
20. Rizzo V., Anesi A., Montalbetti L., Bellantoni G., Trotti R., dEril G. V. M.: *Reference values of neuroactive amino acids in the cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with electrochemical and fluorescence detection*. J Chromatogr A 729, 181-188 (1996).
21. Wallingford R. A., Ewing A. G.: *Capillary Zone Electrophoresis with Electrochemical Detection*. Anal Chem 59, 1762-1766 (1987).
22. Wallingford R. A., Ewing A. G.: *Separation of Serotonin from Catechols by Capillary Zone Electrophoresis with Electrochemical Detection*. Anal Chem 61, 98-100 (1989).
23. McCreedy T., Fielden P. R.: *Amperometric Detector for High-Performance Liquid-Chromatography, Featuring a Glassy-Carbon Working Electrode Array in the Wall-Jet Configuration*. Analyst 120, 2343-2346 (1995).
24. Yu L. S., Xu X. Q., Huang L., Ling J. M., Chen G. N.: *Separation and determination of flavonoids using microemulsion EKC with electrochemical detection*. Electrophoresis 29, 726-733 (2008).
25. Mattusch J., Welsch T., Werner G.: *Hplc-Electrochemical Detector with a Carbon-Fiber Working Electrode*. J Prak Chem-Chem Ztg 334, 49-52 (1992).

26. Kuklinski N. J., Berglund E. C., Engelbrektsson J., Ewing A. G.: *Biogenic Amines in Microdissected Brain Regions of Drosophila melanogaster Measured with Mice liar Electrokinetic Capillary Chromatography-Electrochemical Detection*. *Anal Chem* 82, 7729-7735 (2010).
27. Dong Q., Dong R., Jin M. L., Jin W. R.: *Direct amperometric determination of lactate at a carbon fiber bundle microdisk electrode by capillary zone electrophoresis*. *J Chromatogr B* 774, 121-126 (2002).
28. Sun J. Y., Zheng C. Y., Xiao X. L., Niu L., You T. Y., Wang E. K.: *Electrochemical detection of methimazole by capillary electrophoresis at a carbon fiber microdisk electrode*. *Electroanal* 17, 1675-1680 (2005).
29. Nemcova L., Zima J., Barek J., Janovska D.: *Determination of resveratrol in grains, hulls and leaves of common and tartary buckwheat by HPLC with electrochemical detection at carbon paste electrode*. *Food Chem* 126, 374-378 (2011).
30. Cheng X., Zhang S., Zhang H. Y., Wang Q. J., He P. G., Fang Y. Z.: *Determination of carbohydrates by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a nano-nickel oxide modified carbon paste electrode*. *Food Chem* 106, 830-835 (2008).
31. Chicharro M., Bermejo E., Ongay S., Zapardiel A.: *Determination of maleic hydrazide in potato samples using capillary electrophoresis with dual detection (UV-electrochemical)*. *Electroanal* 20, 534-541 (2008).
32. Jirovsky D., Horakova D., Kotoucek M., Valentova K., Ulrichova J.: *Analysis of phenolic acids in plant materials using HPLC with amperometric detection at a platinum tubular electrode*. *J Sep Sci* 26, 739-742 (2003).
33. Li X. M., Zhang F., Zhang S. S.: *Capillary electrophoresis enzyme immunoassay for alpha-fetoprotein and thyroxine in human serum with electrochemical detection*. *J Sep Sci* 31, 336-340 (2008).
34. Cvacka J., Opekar F., Barek J., Zima J.: *An amperometric detector with a platinum tubular electrode for high performance liquid chromatography*. *Electroanal* 12, 39-43 (2000).
35. Kreuzig F., Frank J.: *Rapid Automated-Determination of Deuterium-Penicillamine in Plasma and Urine by Ion-Exchange High-Performance Liquid-Chromatography with Electrochemical Detection Using a Gold Electrode*. *J Chromatogr* 218, 615-620 (1981).

36. Martin L. G., Jongwana L. T., Crouch A. M.: *Capillary electrophoretic separation and post-column electrochemical detection of mercury and methyl mercury and applications to coal samples*. *Electrochim Acta* 55, 4303-4308 (2010).
37. Trojanowicz M., Martin G. B., Meyerhoff M. E.: *Reversed-phase HPLC of peptides with tetraphenylporphyrin-based stationary phase and potentiometric detection with a copper electrode*. *Chem Anal-Warsaw* 41, 521-530 (1996).
38. Yang W. C., Dai Y. Q., Yu A. M., Chen H. Y.: *Simultaneous determination of polycarboxylic acids by capillary electrophoresis with a copper electrode*. *J Chromatogr A* 867, 261-269 (2000).
39. Schlager J. W., Baldwin R. P.: *Liquid-Chromatography Electrochemical Detection of Ferrocytochrome-C and Ferricytochrome-C at a Chemically Modified Gold Electrode*. *J Chromatogr* 390, 379-389 (1987).
40. Pei J. H., Li X. Y.: *Xanthine and hypoxanthine sensors based on xanthine oxidase immobilized on a CuPtCl<sub>6</sub> chemically modified electrode and liquid chromatography electrochemical detection*. *Anal Chim Acta* 414, 205-213 (2000).
41. Dong S. Q., Chi L. Z., He P. G., Wang Q. J., Fang Y. Z.: *Simultaneous determination of antioxidants at a chemically modified electrode with vitamin B-12 by capillary zone electrophoresis coupled with amperometric detection*. *Talanta* 80, 809-814 (2009).
42. Ivandini T. A., Sarada B. V., Terashima C., Rao T. N., Tryk D. A., Ishiguro H., Kubota Y., Fujishima A.: *Electrochemical detection of tricyclic antidepressant drugs by HPLC using highly boron-doped diamond electrodes*. *J Electroanal Chem* 521, 117-126 (2002).
43. Chailapakul O., Siangproh W., Sarada B. V., Terashima C., Rao T. N., Tryk D. A., Fujishima A.: *The electrochemical oxidation of homocysteine at boron-doped diamond electrodes with application to HPLC amperometric detection*. *Analyst* 127, 1164-1168 (2002).
44. Terashima C., Rao T. N., Sarada B. V., Tryk D. A., Fujishima A.: *Electrochemical oxidation of chlorophenols at a boron-doped diamond electrode and their determination by high-performance liquid chromatography with amperometric detection*. *Anal Chem* 74, 895-902 (2002).

45. Wang J., Chen G., Chatrathi M. P., Fujishima A., Tryk D. A., Shin D.: *Microchip capillary electrophoresis coupled with a boron-doped diamond electrode-based electrochemical detector*. Anal Chem 75, 935-939 (2003).
46. Shin D. C., Tryk D. A., Fujishima A., Muck A., Chen G., Wang J.: *Microchip capillary electrophoresis with a boron-doped diamond electrochemical detector for analysis of aromatic amines*. Electrophoresis 25, 3017-3023 (2004).
47. Wang J., Chen G., Muck A., Shin D. C., Fujishima A.: *Microchip capillary electrophoresis with a boron-doped diamond electrode for rapid separation and detection of purines*. J Chromatogr A 1022, 207-212 (2004).
48. Bartosova Z., Jirovsky D., Horna A.: *High-performance liquid chromatographic method with amperometric detection employing boron-doped diamond electrode for the determination of sildenafil, vardenafil and their main metabolites in plasma*. J Chromatogr A 1218, 7996-8001 (2011).
49. Bartosova Z., Riman D., Jakubec P., Halouzka V., Hrbac J., Jirovsky D.: *Electrochemically Pretreated Carbon Microfiber Electrodes as Sensitive HPLC-EC Detectors*. Sci World J, (2012).
50. Inoue J., Kaneta T., Imasaka T.: *Sheath-flow electrochemical detection of amino acids with a copper wire electrode in capillary electrophoresis*. Electrophoresis 33, 2743-2747 (2012).
51. Bruckens.S, Raogadde R.: *Use of a Porous Electrode for in-Situ Mass Spectrometric Determination of Volatile Electrode Reaction Products*. J Am Chem Soc 93, 793-& (1971).
52. Hambitzer G., Heitbaum J.: *Electrochemical Thermospray Mass-Spectrometry*. Anal Chem 58, 1067-1070 (1986).
53. Phillips L. R., Bartmess J. E.: *Electrochemically Assisted Fast Atom Bombardment Negative-Ion Mass-Spectrometry of Quinones*. Biomed Environ Mass 18, 878-883 (1989).
54. Diehl G., Liesener A., Karst U.: *Liquid chromatography with post-column electrochemical treatment and mass spectrometric detection of non-polar compounds*. Analyst 126, 288-290 (2001).



55. Zhang T. Y., Brajter-Toth A.: *On-line investigation of the generation of nonaqueous intermediate radical cations by electrochemistry/mass spectrometry*. Anal Chem 72, 2533-2540 (2000).
56. Zhou F. M.: *Electrochemistry combined on-line with atomic mass spectrometry and related techniques for trace-metal analysis and electrode-reaction studies*. Trac-Trend Anal Chem 24, 218-227 (2005).
57. Zhou F. M., Vanberkel G. J.: *Electrochemistry Combined Online with Electrospray Mass-Spectrometry*. Anal Chem 67, 3643-3649 (1995).
58. Chen L., Hofmann D., Klumpp E., Xiang X. Y., Chen Y. X., Kuppers S.: *Bottom-up approach for the reaction of xenobiotics and their metabolites with model substances for natural organic matter by electrochemistry-mass spectrometry (EC-MS)*. Chemosphere 89, 1376-1383 (2012).
59. Skopalova J., Vacek J., Papouskova B., Jirovsky D., Maier V., Ranc V.: *Electrochemical oxidation of berberine and mass spectrometric identification of its oxidation products*. Bioelectrochemistry 87, 15-20 (2012).
60. Jahn S., Seiwert B., Kretzing S., Abraham G., Regenthal R., Karst U.: *Metabolic studies of the Amaryllidaceous alkaloids galantamine and lycorine based on electrochemical simulation in addition to in vivo and in vitro models*. Anal Chim Acta 756, 60-72 (2012).
61. Lohmann W., Karst U.: *Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism*. Anal Bioanal Chem 391, 79-96 (2008).
62. Permentier H. P., Bruins A. P.: *Electrochemical oxidation and cleavage of proteins with on-line mass spectrometric detection: Development of an instrumental alternative to enzymatic protein digestion*. J Am Soc Mass Spectr 15, 1707-1716 (2004).
63. Permentier H. P., Jurva U., Barroso B., Bruins A. P.: *Electrochemical oxidation and cleavage of peptides analyzed with on-line mass spectrometric detection*. Rapid Commun Mass Sp 17, 1585-1592 (2003).
64. Baumann A., Lohmann W., Jahn S., Karst U.: *On-Line Electrochemistry/Electrospray Ionization Mass Spectrometry (EC/ESI-MS) for the Generation and Identification of Nucleotide Oxidation Products*. Electroanal 22, 286-292 (2010).

65. Chen H., Zhang Y. H., Mutlib A. E., Zhong M.: *Application of on-line electrochemical derivatization coupled with high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry for detection and quantitation of (p-chlorophenyl)aniline in biological samples*. Anal Chem 78, 2413-2421 (2006).
66. Pretty J. R., Van Berkel G. J.: *Electrochemical sample pretreatment coupled on-line with electrospray mass spectrometry for enhanced elemental analysis*. Rapid Commun Mass Sp 12, 1644-1652 (1998).
67. Li J. W., Dewald H. D., Chen H.: *Online Coupling of Electrochemical Reactions with Liquid Sample Desorption Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*. Anal Chem 81, 9716-9722 (2009).
68. Liu P. Y., Lanekoff I. T., Laskin J., Dewald H. D., Chen H.: *Study of Electrochemical Reactions Using Nanospray Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Anal Chem 84, 5737-5743 (2012).
69. Karst U.: *Electrochemistry/mass spectrometry (EC/MS) - A new tool to study drug metabolism and reaction mechanisms*. Angew Chem Int Edit 43, 2476-2478 (2004).
70. Faber H., Melles D., Brauckmann C., Wehe C. A., Wentker K., Karst U.: *Simulation of the oxidative metabolism of diclofenac by electrochemistry/(liquid chromatography)/mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem 403, 345-354 (2012).
71. Jahn S., Baumann A., Roscher J., Hense K., Zazzeroni R., Karst U.: *Investigation of the biotransformation pathway of verapamil using electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry - A comparative study with liver cell microsomes*. J Chromatogr A 1218, 9210-9220 (2011).
72. Baumann A., Lohmann W., Schubert B., Oberacher H., Karst U.: *Metabolic studies of tetrazepam based on electrochemical simulation in comparison to in vivo and in vitro methods*. J Chromatogr A 1216, 3192-3198 (2009).
73. Lohmann W., Karst U.: *Electrochemistry meets enzymes: instrumental on-line simulation of oxidative and conjugative metabolism reactions of toremifene*. Anal Bioanal Chem 394, 1341-1348 (2009).
74. Blankert B., Hayen H., van Leeuwen S. M., Karst U., Bodoki E., Lotrean S., Sandulescu R., Diez N. M., Dominguez O., Arcos J., Kauffmann J. M.: *Electrochemical, chemical and enzymatic oxidations of phenothiazines*. Electroanal 17, 1501-1510 (2005).

75. Bussy U., Ferchaud-Roucher V., Tea I., Krempf M., Silvestre V., Boujtita M.: *Electrochemical oxidation behavior of Acebutolol and identification of intermediate species by liquid chromatography and mass spectrometry*. *Electrochim Acta* 69, 351-357 (2012).
76. Nozaki K., Kitagawa H., Kimura S., Kagayama A., Arakawa R.: *Investigation of the electrochemical oxidation products of zotepine and their fragmentation using on-line electrochemistry/electrospray ionization mass spectrometry*. *J Mass Spectrom* 41, 606-612 (2006).
77. Jirovsky D., Bednar P., Myjavcova R., Bartosova Z., Skopalova J., Tvrdonova M., Lemr K.: *Study of electrochemical oxidation of cyanidin glycosides by online combination of electrochemistry with electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *Monatsh Chem* 142, 1211-1217 (2011).
78. Nouri-Nigjeh E., Permentier H. P., Bischoff R., Bruins A. P.: *Electrochemical Oxidation by Square-Wave Potential Pulses in the Imitation of Oxidative Drug Metabolism*. *Anal Chem* 83, 5519-5525 (2011).
79. Jahn S., Faber H., Zazzeroni R., Karst U.: *Electrochemistry/mass spectrometry as a tool in the investigation of the potent skin sensitizer p-phenylenediamine and its reactivity toward nucleophiles*. *Rapid Commun Mass Sp* 26, 1453-1464 (2012).
80. Simon H., Melles D., Jacquilleot S., Sanderson P., Zazzeroni R., Karst U.: *Combination of Electrochemistry and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Metabolism Studies*. *Anal Chem* 84, 8777-8782 (2012).
81. Markova E., Smyslova P., Macikova P., Skopalova J., Bartak P.: *Study of Anodic Oxidation of 2,4,6-Tribromophenol*. *Chem Listy* 106, 195-199 (2012).
82. Odijk M., Baumann A., Lohmann W., van den Brink F. T. G., Olthuis W., Karst U., van den Berg A.: *A microfluidic chip for electrochemical conversions in drug metabolism studies*. *Lab Chip* 9, 1687-1693 (2009).
83. Odijk M., Baumann A., Olthuis W., van den Berg A., Karst U.: *Electrochemistry-on-chip for on-line conversions in drug metabolism studies*. *Biosens Bioelectron* 26, 1521-1527 (2010).
84. Gosser D. K., Jr.: *Cyclic Voltammetry, Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms*, VCH publishers, New York 1993.

85. Marken F., Neudeck A., Bond A. M.: *Electroanalytical Methods, Guide to Experiments and Applications* (Ed.: Scholz F.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2002.
86. Heyrovský J., Kůta J.: *Základy polarografie* (Eds. Prchal J., Klejnová J., Řehák J.), Nakladatelství Československé akademie věd, Praha 1962.
87. Papouchado L., Petrie G., Adams R. N.: *Anodic-Oxidation Pathways of Phenolic Compounds .1. Anodic Hydroxylation Reactions*. J Electroanal Chem 38, 389-395 (1972).
88. Papouchado L., Sandford R. W., Petrie G., Adams R. N.: *Anodic-Oxidation Pathways of Phenolic Compounds .2. Stepwise Electron Transfers and Coupled Hydroxylations*. J Electroanal Chem 65, 275-284 (1975).
89. Parker V. D., Ronlan A.: *Anodic Oxidation of Phenolic Compounds .1. Mechanism of Anodic Oxidation of 2,6-Di-Tert-Butyl Para Cresol*. J Electroanal Chem 30, 502-505 (1971).
90. Ronlan A., Parker V. D.: *Anodic Oxidation of Phenolic Compounds .2. Products and Mechanism of Anodic Oxidation of Hindered Phenols*. J Chem Soc C, 3214-3218 (1971).
91. Švancara I., Vytras K.: *Preparation and Properties of Carbon-Paste Electrodes*. Chem Listy 88, 138-146 (1994).
92. Kalcher K.: *Chemically Modified Carbon Paste Electrodes in Voltammetric Analysis*. Electroanal 2, 419-433 (1990).
93. Švancara I., Kalcher K., Vytřas K.: *Fifty years of carbon paste electrodes in fact, numbers and notes: Non-Traditional Reminiscence of an Jubilee in Electrochemistry and Electroanalysis*, str. 7. In: Sensing in Electroanalysis, Vol. 3, (Vytřas K., Kalcher K., Švancara I., eds.), University of Pardubice, Pardubice 2008.
94. Baker R., Wilkinson D. P., Zhang J. J.: *Electrocatalytic activity and stability of substituted iron phthalocyanines towards oxygen reduction evaluated at different temperatures*. Electrochim Acta 53, 6906-6919 (2008).
95. Qi X. H., Baldwin R. P.: *Liquid-Chromatography and Electrochemical Detection of Organic Peroxides by Reduction at an Iron Phthalocyanine Chemically-Modified Electrode*. Electroanal 5, 547-554 (1993).

96. Yu C. S., Choi H., Kim S.: *Electrocatalytic reduction of sulfur dioxide by iron phthalocyanine monolayer in acidic conditions*. Chem Lett, 648-649 (2002).
97. Choi H. J., Kwag G., Kim S.: *Electrochemical and XAFS investigation of nitrite reduction by heat-treated mu-oxo derivative of iron phthalocyanine supported on high area carbon*. J Electroanal Chem 508, 105-114 (2001).
98. Grodkowski J., Dhanasekaran T., Neta P., Hambricht P., Brunschwig B. S., Shinozaki K., Fujita E.: *Reduction of cobalt and iron phthalocyanines and the role of the reduced species in catalyzed photoreduction of CO<sub>2</sub>*. J Phys Chem A 104, 11332-11339 (2000).
99. Zagal J. H.: *Metallophthalocyanines as Catalysts in Electrochemical Reactions*. Coordin Chem Rev 119, 89-136 (1992).
100. Oni J., Nyokong T.: *Simultaneous voltammetric determination of dopamine and serotonin on carbon paste electrodes modified with iron(II) phthalocyanine complexes*. Anal Chim Acta 434, 9-21 (2001).
101. Shahrokhian S., Ghalkhani M., Amini M. K.: *Application of carbon-paste electrode modified with iron phthalocyanine for voltammetric determination of epinephrine in the presence of ascorbic acid and uric acid*. Sensor Actuat B-Chem 137, 669-675 (2009).
102. Amini M. K., Shahrokhian S., Tangestaninejad S., Mirkhani V.: *Iron(II) phthalocyanine-modified carbon-paste electrode for potentiometric detection of ascorbic acid*. Anal Biochem 290, 277-282 (2001).
103. Shahrokhian S., Ghalkhani M., Amini M. K.: *Application of carbon-paste electrode modified with iron phthalocyanine for voltammetric determination of epinephrine in the presence of ascorbic acid and uric acid*. Sensor Actuat B-Chem 137, 669-675 (2009).
104. Siswana M., Ozoemena K. I., Nyokong T.: *Electrocatalytic behaviour of carbon paste electrode modified with iron(II) phthalocyanine (FePc) nanoparticles towards the detection of amitrole*. Talanta 69, 1136-1142 (2006).
105. Zhang Y., Zheng J. B.: *Comparative investigation on electrochemical behavior of hydroquinone at carbon ionic liquid electrode, ionic liquid modified carbon paste electrode and carbon paste electrode*. Electrochim Acta 52, 7210-7216 (2007).
106. Musameh M., Wang J.: *Sensitive and stable amperometric measurements at ionic liquid-carbon paste microelectrodes*. Anal Chim Acta 606, 45-49 (2008).

107. Wei D., Ivaska A.: *Applications of ionic liquids in electrochemical sensors*. Anal Chim Acta 607, 126-135 (2008).
108. Sun W., Yang M. X., Jiao K.: *Electrocatalytic oxidation of dopamine at an ionic liquid modified carbon paste electrode and its analytical application*. Anal Bioanal Chem 389, 1283-1291 (2007).
109. Ojani R., Raof J. B., Zamani S.: *A New and Simple Electrocatalyst for Formaldehyde Oxidation; Nickel/poly(o-Anisidine)/Film Modified Ionic Liquid Carbon Paste Electrode*. J Chin Chem Soc-Taip 60, 488-494 (2013).
110. Franzoi A. C., Vieira I. C., Dupont J.: *Biosensors of Laccase Based on Hydrophobic Ionic Liquids Derived from Imidazolium Cation*. J Brazil Chem Soc 21, 1451-1458 (2010).
111. Macikova P., Halouzka V., Hrbac J., Bartak P., Skopalova J.: *Electrochemical Behavior and Determination of Rutin on Modified Carbon Paste Electrodes*. Sci World J, DOI: 10.1100/2012/394756, (2012).
112. Product Monograph <sup>PR</sup>Detrol\* (tolterodine L-tartrate), Pfizer Canada Inc 2010.
113. Wefer J., Truss M. C., Jonas U.: *Tolterodine: an overview*. World J Urol 19, 312-318 (2001).
114. Aberg G. (Bridge Pharma Inc.), US Patent 6310103, 2001.
115. Postlind H., Danielson A., Lindgren A., Andersson S. H. G.: *Tolterodine, a new muscarinic receptor antagonist, is metabolized by cytochromes P450 2D6 and 3A in human liver microsomes*. Drug Metab Dispos 26, 289-293 (1998).
116. Product monograph <sup>Pr</sup>Toviaz<sup>TM</sup> (fesoterodine fumarate), Pfizer Canada Inc. 2012.
117. Malhotra B., Gandelman K., Sachse R., Wood N., Michel M. C.: *The Design and Development of Fesoterodine as a Prodrug of 5-hydroxymethyltolterodine (5-HMT), the Active Metabolite of Tolterodine*. Curr Med Chem 16, 4481-4489 (2009).
118. Herschorn S., Swift S., Guan Z. H., Carlsson M., Morrow J. D., Brodsky M., Gong J.: *Comparison of fesoterodine and tolterodine extended release for the treatment of overactive bladder: a head-to-head placebo-controlled trial*. Bju Int 105, 58-66 (2010).

119. Chapple C. R., Van Kerrebroeck P. E., Junemann K. P., Wang J. T., Brodsky M.: *Comparison of fesoterodine and tolterodine in patients with overactive bladder*. *Bju Int* 102, 1128-1132 (2008).
120. Malhotra B., Guan Z., Wood N., Gandelman K.: *Pharmacokinetic profile of fesoterodine*. *Int J Clin Pharm Th* 46, 556-563 (2008).
121. Ellsworth P., Berriman S. J., Brodsky M.: *Fesoterodine: a new agent for treating overactive bladder*. *Am J Manag Care* 15, S115-117 (2009).
122. [www.selleckchem.com](http://www.selleckchem.com), staženo 20. 2. 2013.
123. [www.scbt.com](http://www.scbt.com), staženo 20. 2. 2013.
124. Zhang B., Zhang Z., Tian Y., Xu F.: *High performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric determination of tolterodine tartrate in human plasma*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 824, 92-98 (2005).
125. Macek J., Ptacek P., Klima J.: *Determination of tolterodine and its 5-hydroxymethyl metabolite in human plasma by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr B* 877, 968-974 (2009).
126. Yadav M., Upadhyay V., Chauhan V., Solanki G., Jani A., Baxi G. A., Singhal P., Shrivastav P. S.: *LC-MS-MS Separation and Simultaneous Determination of Tolterodine and its Active Metabolite, 5-hydroxymethyltolterodine in Human Plasma*. *Chromatographia* 72, 255-264 (2010).
127. Saxena V., Zaheer Z., Farooqui M.: *Stability-indicating HPLC determination of tolterodine tartrate in pharmaceutical dosage form*. *Indian J Chem Techn* 13, 242-246 (2006).
128. Madhavi A., Reddy G. S., Suryanarayana M. V., Naidu A.: *Development and validation of a new analytical method for the determination of related components in tolterodine tartarate using LC*. *Chromatographia* 68, 399-407 (2008).
129. Sinha V. R., Jindal V., Kumar R. V., Bhinge J. R., Goel H.: *Development and Validation of a Simple, Stability-Indicating High-Performance Liquid Chromatographic Method for Analysis of Tolterodine Tartrate in the Bulk Drug and in its Tablet Formulation*. *Acta Chromatogr* 23, 133-143 (2011).

130. Xia Z. L., Chen Z. Y., Yao T. W.: *An enantiospecific HPLC method for the determination of (S)-enantiomer impurities in (R)-tolterodine tartarate*. *Pharmazie* 62, 170-173 (2007).
131. Puchalska M., Zagrodzka J., Czerniec-Michalik E., Zezula M., Chmiel J., Luniewski W., Zagrodzki B.: *Determination of the enantiomeric purity and the in-process control by HPLC in the technology for production of optically active ingredients on an example of tolterodine tartrate*. *Przem Chem* 91, 358-364 (2012).
132. Palmer L., Andersson L., Andersson T., Stenberg U.: *Determination of tolterodine and the 5-hydroxymethyl metabolite in plasma, serum and urine using gas chromatography mass spectrometry*. *J Pharmaceut Biomed* 16, 155-165 (1997).
133. Lehnert P., Pribylka A., Maier V., Znalezionna J., Sevcik J., Dousa M.: *Enantiomeric separation of R,S-tolterodine and R,S-methoxytolterodine with negatively charged cyclodextrins by capillary electrophoresis*. *J Sep Sci* 36, 1561-1567 (2013).
134. Fakhari A. R., Tabani H., Behdad H., Nojavan S., Taghizadeh M.: *Electrically-enhanced microextraction combined with maltodextrin-modified capillary electrophoresis for quantification of tolterodine enantiomers in biological samples*. *Microchem J* 106, 186-193 (2013).
135. Sankar D. G., Krishna M. V., Kumar D. V. P., Latha R. M.: *UV spectrophotometric determination of tolterodine tartarate and cefepime*. *Asian J Chem* 17, 2028-2030 (2005).
136. Sankar D. G., Rao B. D., Latha P. V. M., Krishna M. V.: *Spectrophotometric determination of tolterodine tartarate and repaglinide*. *Asian J Chem* 19, 1616-1618 (2007).
137. Fraihat S. M., Khatib H. S.: *Indirect Spectrophotometric Determination of Tolterodine Tartrate in Pure and Pharmaceutical Preparations*. *Asian J Chem* 25, 1887-1890 (2013).
138. Sangoi M. S., Steppe M.: *Determination of fesoterodine in pharmaceutical formulations by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Eur J Mass Spectrom* 16, 653-661 (2010).
139. Sangoi M. S., Todeschini V., Steppe M.: *Second-Order Derivative UV Spectrophotometric Method for the Determination of Fesoterodine and Comparison*



- with LC, CE and LC-MS/MS in Commercial Extended-Release Tablets. Acta Chim Slov* 59, 136-143 (2012).
140. Sangoi M. S., Todeschini V., Steppe M.: *Fesoterodine stress degradation behavior by liquid chromatography coupled to ultraviolet detection and electrospray ionization mass spectrometry. Talanta* 84, 1068-1079 (2011).
141. Parekh J. M., Sanyal M., Yadav M., Shrivastav P. S.: *Investigation of ex vivo stability of fesoterodine in human plasma and its simultaneous determination together with its active metabolite 5-HMT by LC-ESI-MS/MS: Application to a bioequivalence study. J Chromatogr B* 913, 1-11 (2013).
142. Macikova P., Skopalova J., Cankar P., Papouskova B., Strakova R., Jirovsky D., Maier V.: *Electrochemical Oxidation of Tolterodine. Electroanal* 25, 205-212 (2013).
143. Lee W., Ku S. K., Bae J. S.: *Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. Food Chem Toxicol* 50, 3048-3055 (2012).
144. Arima H., Ashida H., Danno G.: *Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against Bacillus cereus and Salmonella enteritidis. Biosci Biotech Bioch* 66, 1009-1014 (2002).
145. Abdel-Raheem I. T.: *Gastroprotective Effect of Rutin against Indomethacin-Induced Ulcers in Rats. Basic Clin Pharmacol* 107, 742-750 (2010).
146. Khan M. M., Raza S. S., Javed H., Ahmad A., Khan A., Islam F., Safhi M. M., Islam F.: *Rutin Protects Dopaminergic Neurons from Oxidative Stress in an Animal Model of Parkinson's Disease. Neurotox Res* 22, 1-15 (2012).
147. Undeger U., Aydin S., Basaran A. A., Basaran N.: *The modulating effects of quercetin and rutin on the mitomycin C induced DNA damage. Toxicol Lett* 151, 143-149 (2004).
148. Park S. Y., Bok S. H., Jeon S. M., Park Y. B., Lee S. J., Jeong T. S., Choi M. S.: *Effect of rutin and tannic acid supplements on cholesterol metabolism in rats. Nutr Res* 22, 283-295 (2002).
149. Panchal S. K., Poudyal H., Arumugam T. V., Brown L.: *Rutin Attenuates Metabolic Changes, Nonalcoholic Steatohepatitis, and Cardiovascular Remodeling in High-Carbohydrate, High-Fat Diet-Fed Rats. J Nutr* 141, 1062-1069 (2011).

150. Ostrakhovitch E. A., Afanas'ev I. B.: *Oxidative stress in rheumatoid arthritis leukocytes: suppression by rutin and other antioxidants and chelators*. *Biochem Pharmacol* 62, 743-746 (2001).
151. Budavari S., O'Neil M. J., Smith A. (Eds.): *The Merck Index*, str. 1428, 12. vydání, Merck, New York 1996.
152. Yang J., Qian D. W., Jiang S., Shang E. X., Guo J. M., Duan J. A.: *Identification of rutin deglycosylated metabolites produced by human intestinal bacteria using UPLC-Q-TOF/MS*. *J Chromatogr B* 898, 95-100 (2012).
153. Jiang P., Burczynski F., Campbell C., Pierce G., Austria J. A., Briggs C. J.: *Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F-tataricum*, and *F-homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation*. *Food Res Int* 40, 356-364 (2007).
154. Kreft I., Fabjan N., Yasumoto K.: *Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products*. *Food Chem* 98, 508-512 (2006).
155. Grynová L., Škeříková V., Jandera P., Kellner V., Horna A.: *Porovnání výskytu fenolických látek a flavonoidů v českých a zahraničních pivech metodou HPLC s coularray detekcí*, str. 47. In: *Vitamíny 2003 - přírodní antioxidanty a volné radikály: 3rd international conference Vitamins 2003, Pardubice 15. - 17. 9. 2003, sborník přednášek*. Blatná J., Horna A. (Eds.), Univerzita Pardubice 2003.
156. Jiang L. F., Zhou G. M., Li Y. Y.: *Micelle-Mediated Extraction for the Analysis of Chlorogenic Acid, Rutin, and Quercetin in Honeysuckle by Hplc-Uv*. *J Liq Chromatogr R T* 34, 1473-1487 (2011).
157. Cheng S., Qiu F., Huang J., He J. Q.: *Simultaneous determination of vitexin-2"-O-glucoside, vitexin-2"-O-rhamnoside, rutin, and hyperoside in the extract of hawthorn(*Crataegus pinnatifida* Bge.) leaves by RP-HPLC with ultraviolet photodiode array detection*. *J Sep Sci* 30, 717-721 (2007).
158. Bojarowicz H., Marszall M. P., Wnuk M., Gorynski K., Bucinski A.: *Determination of Rutin in Plant Extracts and Emulsions by HPLC-MS*. *Anal Lett* 44, 1728-1737 (2011).

159. Danila A. M., Kotani A., Hakamata H., Kusu F.: *Determination of rutin, catechin, epicatechin, and epicatechin gallate in buckwheat *Fagopyrum esculentum* moench by micro-high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.* J Agr Food Chem 55, 1139-1143 (2007).
160. Wu H. W., Chen M. L., Fan Y. C., Elsebaei F., Zhu Y.: *Determination of rutin and quercetin in Chinese herbal medicine by ionic liquid-based pressurized liquid extraction-liquid chromatography-chemiluminescence detection.* Talanta 88, 222-229 (2012).
161. Keki S., Deak G., Zsuga M.: *Fragmentation study of rutin, a naturally occurring flavone glycoside cationized with different alkali metal ions, using post-source decay matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.* J Mass Spectrom 36, 1312-1316 (2001).
162. Petkovic M., Vujacic A., Schiller J., Bugarcic Z., Savic J., Vasic V.: *Application of flavonoids - quercetin and rutin - as new matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of Pt(II) and Pd(II) complexes.* Rapid Commun Mass Sp 23, 1467-1475 (2009).
163. Guo M. Q., Song F. R., Liu Z. Q., Liu S. Y.: *Characterization of non-covalent complexes of rutin with cyclodextrins by electrospray ionization tandem mass spectrometry.* J Mass Spectrom 39, 594-599 (2004).
164. Zafra A., Juarez W. J. B., Blanc R., Navalon A., Gonzalez J., Vilchez J. L.: *Determination of polyphenolic compounds in wastewater olive oil by gas chromatography-mass spectrometry.* Talanta 70, 213-218 (2006).
165. Li X. J., Zhang Y. P., Yuan Z. B.: *Separation and determination of rutin and vitamin C in compound rutin tablets by capillary electrophoresis with amperometric detection.* Chinese J Anal Chem 30, 815-818 (2002).
166. Zvezdanovic J. B., Stanojevic J. S., Markovic D. Z., Cvetkovic D. J.: *Irreversible UV-induced quercetin and rutin degradation in solution studied by UV spectrophotometry and HPLC chromatography.* J Serb Chem Soc 77, 297-312 (2012).

167. Morishita T., Ishiguro K., Sato T.: *Use of Nuclear Magnetic Resonance method for detection of rutin-degrading enzyme activity in Fagopyrum esculentum and F-tartaricum*. *Breeding Sci* 48, 17-21 (1998).
168. Leona M., Stenger J., Ferloni E.: *Application of surface-enhanced Raman scattering techniques to the ultrasensitive identification of natural dyes in works of art*. *J Raman Spectrosc* 37, 981-992 (2006).
169. Hua R., Sun S. Q., Zhou Q.: *Study of thermal perturbation of rutin by two dimensional correlation. Analysis and Fourier transform infrared spectroscopy*. *Chinese J Anal Chem* 31, 541-547 (2003).
170. Ghica M. E., Brett A. M. O.: *Electrochemical oxidation of rutin*. *Electroanal* 17, 313-318 (2005).
171. Macíková P.: *Bakalářská práce*. Univerzita Palackého v Olomouci, 2007.
172. He J. B., Wang Y., Deng N., Zha Z. G., Lin X. Q.: *Cyclic voltammograms obtained from the optical signals: Study of the successive electro-oxidations of rutin*. *Electrochim Acta* 52, 6665-6672 (2007).
173. Sokolova R., Ramesova S., Degano I., Hromadova M., Gal M., Zabka J.: *The oxidation of natural flavonoid quercetin*. *Chem Commun* 48, 3433-3435 (2012).
174. Medvidovic-Kosanovic M., Seruga M., Jakobek L., Novak I.: *Electrochemical and Antioxidant Properties of Rutin*. *Collect Czech Chem C* 75, 547-561 (2010).
175. Zare H. R., Samimi R., Mazloun-Ardakani M.: *A Comparison of the Electrochemical Behavior of Rutin at an Inactivated, Activated, and Multi Wall Carbon Nanotubes Modified Glassy Carbon Electrode*. *Int J Electrochem Sc* 4, 730-739 (2009).
176. Zhao J. Z., Yao X. J., Sun D. Z.: *A study on the derivative adsorption chronopotentiometry of the bismuth(III)-rutin system*. *Chinese J Anal Chem* 32, 946-948 (2004).
177. Zoulis N. E., Efstathiou C. E.: *Preconcentration at a carbon-paste electrode and determination by adsorptive-stripping voltammetry of rutin and other flavonoids*. *Anal Chim Acta* 320, 255-261 (1996).

178. Šulc M., Šestáková I.: *Stanovení přírodních polyfenolických antioxidantů na uhlíkové pastové elektrodě modifikované silikagelem*, str. 159. In: Sborník přednášek z XXVII. mezinárodního odborného semináře: Moderní elektrochemické metody, Jetřichovice 21.-24.5.2007. Barek J., Navrátil T. (Eds.), Česká společnost chemická, Praha 2007.
179. Korbut O., Buckova M., Labuda J., Grundler P.: *Voltammetric detection of antioxidative properties of flavonoids using electrically heated DNA modified carbon paste electrode*. *Sensors-Basel* 3, 1-10 (2003).
180. Franzoi A. C., Spinelli A., Vieira L. C.: *Rutin determination in pharmaceutical formulations using a carbon paste electrode modified with poly(vinylpyrrolidone)*. *J Pharmaceut Biomed* 47, 973-977 (2008).
181. Zhanga Y., Zhenga J. B.: *Sensitive voltammetric determination of rutin at an ionic liquid modified carbon paste electrode*. *Talanta* 77, 325-330 (2008).
182. Sun W., Yang M. X., Li Y. Z., Jiang Q., Liu S. F., Jiao K.: *Electrochemical behavior and determination of rutin on a pyridinium-based ionic liquid modified carbon paste electrode*. *J Pharmaceut Biomed* 48, 1326-1331 (2008).
183. Wang Y., Xiong H. Y., Zhang X. H., Wang S. F.: *Detection of rutin at DNA modified carbon paste electrode based on a mixture of ionic liquid and paraffin oil as a binder*. *Microchim Acta* 170, 27-32 (2010).
184. Oliveira A. C., Mascaro L. H.: *Characterization of Carbon Nanotubes Paste Electrode and its Application as Rutin Sensor*. *Curr Anal Chem* 7, 101-109 (2011).
185. Lin X. Q., He J. B., Zha Z. G.: *Simultaneous determination of quercetin and rutin at a multi-wall carbon-nanotube paste electrodes by reversing differential pulse voltammetry*. *Sensor Actuat B-Chem* 119, 608-614 (2006).
186. Rezaei B., Majidi N., Ensafi A. A., Karimi-Maleh H.: *Molecularly imprinted-multiwall carbon nanotube paste electrode as a biosensor for voltammetric detection of rutin*. *Anal Methods-Uk* 3, 2510-2516 (2011).
187. Zhou J., Zhang K., Liu J., Song G., Ye B. X.: *A supersensitive sensor for rutin detection based on multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles modified carbon paste electrodes*. *Anal Methods-Uk* 4, 1350-1356 (2012).
188. Kupka K.: *QC.ExpertTM, Interaktivní analýza dat, Uživatelský manuál, Verze 2.7, TriloByte® Ltd. 2005, str. 155.*

189. Michalkiewicz A., Biesaga M., Pyrzynska K.: *Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey*. J Chromatogr A 1187, 18-24 (2008).
190. Heyrovsky M., Prokopova B.: *Heterogeneous physico-chemical interactions following electrode reaction: Interaction of folates with thiols*. Collect Czech Chem C 62, 172-184 (1997).
191. Levine I. N.: *Physical chemistry, Sixth Edition*, McGraw-Hill, New York 2009, str. 518-523.
192. Brdička R., Dvořák J.: *Základy fyzikální chemie*, Akademia Praha 1977, str. 661-663.
193. Jurva U.: *Thesis, Electrochemistry on-line with mass spectrometry; Instrumental methods for in vitro generation and detection of drug metabolites*. Groningen, 2004.
194. Steckhan E.: *Organic Electrochemistry, 4. vydání* (Eds.: Lund H., Hammerich O.), Marcel Dekker, New York 2001, str. 1130.
195. Henze G.: *Polarographie und Voltametrie, Grundlagen und analytische Praxis*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001, str. 120.
196. Kraft A.: *Doped diamond: A compact review on a new, versatile electrode material*. Int J Electrochem Sc 2, 355-385 (2007).
197. Hammerich O., Utley J. H. P., Ebersson L.: *Organic Electrochemistry, 4. vydání* (Eds.: Lund H., Hammerich O.), Marcel Dekker, New York 2001, str. 1008.
198. Sangoi M. S., Todeschini V., Goelzer G. K., Steppe M.: *Photochemistry of a novel antimuscarinic drug fesoterodine and identification of its photodegradation products by LC-ESI-MS studies*. J Photoch Photobio A 256, 16-22 (2013).
199. Capasso R.: *A review on the electron ionisation and fast atom bombardment mass spectrometry of polyphenols naturally occurring in olive wastes and some of their synthetic derivatives*. Phytochem Analysis 10, 299-306 (1999).
200. Puig D., Barcelo D., Silgoner I., Grasserbauer M.: *Comparison of three different liquid chromatography-mass spectrometry interfacing techniques for the determination of priority phenolic compounds in water*. J Mass Spectrom 31, 1297-1307 (1996).
201. Schäfer H. J.: *Organic Electrochemistry, 4. Vydání* (Eds.: Lund H., Hammerich O.), Marcel Dekker, New York 2001, str. 893.

202. Hammerich O., Utley J. H. P., Ebersson L.: *Organic Electrochemistry*, 4. vydání (Eds.: Lund H., Hammerich O.), Marcel Dekker, New York 2001, str. 611.
203. Steelink C., Britton W. E.: *Electrochemical Oxidation of Lignin Model Compounds .I. Oxidation of 3,5-Dimethoxy-4-Hydroxy-Alpha-Methylbenzyl Alcohol*. *Tetrahedron Lett*, 2869-2872 (1974).
204. Andersson S. H., Lindgren A., Postlind H.: *Biotransformation of tolterodine, a new muscarinic receptor antagonist, in mice, rats, and dogs*. *Drug Metab Dispos* 26, 528-535 (1998).
205. Jovanovic S. V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M. G.: *Flavonoids as Antioxidants*. *J Am Chem Soc* 116, 4846-4851 (1994).
206. Macíková P.: *Diplomová práce*. Univerzita Palackého v Olomouci, 2009.
207. Kachoosangi R. T., Wildgoose G. G., Compton R. G.: *Room temperature ionic liquid carbon nanotube paste electrodes: Overcoming large capacitive currents using rotating disk electrodes*. *Electroanal* 19, 1483-1489 (2007).
208. Sorokin A. B., Kudrik E. V.: *Phthalocyanine metal complexes: Versatile catalysts for selective oxidation and bleaching*. *Catal Today* 159, 37-46 (2011).
209. Zagal J. H., Griveau S., Silva J. F., Nyokong T., Bedioui F.: *Metallophthalocyanine-based molecular materials as catalysts for electrochemical reactions*. *Coordin Chem Rev* 254, 2755-2791 (2010).
210. Morishita T., Yamaguchi H., Degi K.: *The contribution of polyphenols to antioxidative activity in common buckwheat and Tartary buckwheat grain*. *Plant Prod Sci* 10, 99-104 (2007).
211. Barek J., Opekar F., Štulík K.: *Elektroanalytická chemie*. Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, Praha 2005.

# Curriculum vitae

Jméno, příjmení, titul: Pavla Macíková, Mgr.

Datum a místo narození: 30. dubna 1985 ve Zlíně, Česká Republika  
Trvalé bydliště: Tečovice 283, 763 02 Zlín, Česká Republika  
Kontaktní email: p.macikova@seznam.cz

## Pracovní zkušenosti:

*1. 9. 2013 – doposud*

Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta - vědecký pracovník

*1. 11. 2011 – 31. 8. 2013*

Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta - lektor

*2. 5. 2012 – 31. 7. 2012*

Zahraněční vědeckovýzkumná stáž ve výzkumné skupině prof. Wolfganga Lindnera, Christian Doppler Laboratory for Molecular Recognition Materials, Department of Analytical Chemistry and Food Chemistry, University of Vienna, Austria

## Vzdělání:

*2009 – dosud*

Postgraduální studium analytické chemie na PřF UP Olomouc (předpokládané ukončení 2013), téma: Studium a analytické využití elektrochemických transformací biologicky aktivních látek

*2007 – 2009*

Navazující magisterské studium analytické chemie na PřF UP Olomouc, obhájení diplomové práce na téma: Využití modifikovaných uhlíkových pastových elektrod pro voltametrické stanovení rutinu

*2004 – 2007*

Studium bakalářské chemie na PřF UP Olomouc, obhájení bakalářské práce na téma: Studium oxidačně-redukčních vlastností rutinu a kvercetinu

## Jazykové znalosti

Anglický jazyk – vyšší pokročilý, First Certificate in English, Level B2 - prosinec 2010

Německý jazyk – středně pokročilý

Italský jazyk – mírně pokročilý

## Řidičský průkaz - skupina B

## Odborné vědecké zaměření

Analytická chemie, elektrochemie (elektrochemické transformace biologicky aktivních látek, uhlíkové pastové elektrody, biosenzory), elektrochemie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí.



## Pedagogická činnost

- Laboratorní cvičení z Chemické instrumentace pro 3. ročníky bakalářských oborů chemie (2 semestry)
- Laboratorní cvičení „Pokročilá analytická chemie“ pro 1. ročníky navazujícího studia analytické chemie (1 semestr)

## Řešené projekty

- Projekt OP VK č. CZ.1.07/2.3.00/20.0018 „Rozvoj lidských zdrojů pro excelenci ve výzkumu v oblasti nanotechnologií v analytické chemii“ – členka týmu
- Projekt FRVŠ č. 2495/2012/G6 „Inovace úloh a opora výstupů pro laboratorní cvičení zaměřená na instrumentální analytické metody“ – řešitelka
- Projekt FRVŠ č. 1546/2011/G6 „Modernizace a rozšíření úloh do cvičení Chemická instrumentace“ – spoluřešitelka
- Projekt FRVŠ č. 2909/2010/G6 „Inovace obsahu a studijních opor předmětu Projektová výuka v chemii“ – spoluřešitelka
- Členka týmu v projektech studentské grantové soutěže IGA:  
UP PrF\_2013\_030, UP PrF\_2012\_020, UP PrF\_2011\_025, UP PrF\_2010\_028
- CZ.1.05/2.1.00/03.0058 „Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů“ – členka týmu
- CZ.1.07/2.2.00/28.0029 „Modulární výuka jako nástroj odezvy vzdělávacího systému na potřeby praxe“ – členka týmu

## Popularizace vědy a výzkumu

- Přírodovědný jarmark Univerzity Palackého
- Chemický jarmark a přírodovědný cirkus v Ústí nad Labem
- Univerzita dětského věku

## Seznam publikací

- **Macíková P.**, Skopalová J., Cankař P., Papoušková B., Straková R., Jirovský D., Maier V.: *Electrochemical Oxidation of Tolterodine*. *Electroanal* 25, 205-212 (2013).
- Wolrab D., **Macíková P.**, Boras M., Kohout M., Lindner W.: *Strong cation exchange chiral stationary phase - A comparative study in high-performance liquid chromatography and subcritical fluid chromatography*. *J Chromatogr A* 1317, 59-66 (2013).
- Gargano A. F. G., Kohout M., **Macíková P.**, Lämmerhofer M., Lindner W.: *Direct high-performance liquid chromatographic enantioseparation of free alpha-, beta- and gamma-aminophosphonic acids employing cinchona-based chiral zwitterionic ion exchangers*. *Anal Bioanal Chem* 405, 8027-8038 (2013). Počet citací: 1.
- Škríba A., Janková S., Váňa J., Barták P., Bednář P., Fryčák P., Kučera L., Kurka O., Lemr K., **Macíková P.**, Marková E., Novaková P., Papoušková B., Skopalová J., Švecová H., Roithová J.: *Protonation sites and fragmentations of para-aminophenol*. *Int J Mass Spectrom* 337, 18-23 (2013). Počet citací: 1.

- **Macíková P.**, Halouzka V., Hrbáč J., Barták P., Skopalová J.: *Electrochemical Behavior and Determination of Rutin on Modified Carbon Paste Electrodes*. Sci World J (2012), DOI: 10.1100/2012/394756. Počet citací: 1.
- Marková E., Smyslová P., **Macíková P.**, Skopalová J., Barták P.: *Study of Anodic Oxidation of 2,4,6-Tribromophenol*. Chem Listy 106, 195-199 (2012).
- **Macíková P.**, Skopalová J.: *A Comparison of Variously Modified Carbon Paste Electrodes for Determination of Rutin*. Modern Electrochemical Methods Xxx, 101-105 (2010).
- Mrázová V., **Macíková P.**, Myjavcová R., Ginterová P., Müller L.: „*E-learningové opory předmětů Projektová výuka v chemii a Cvičení z analytické chemie*“, Media4u Magazine - Journal for Education 7 (2010) 132-137.

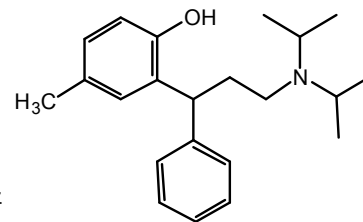
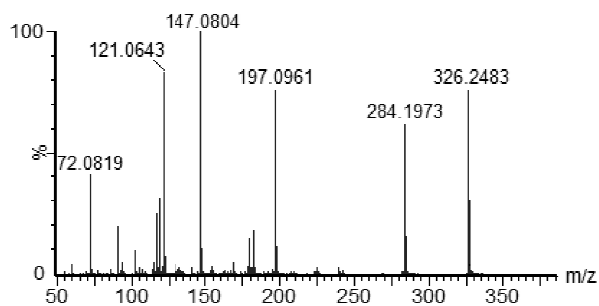
### Prezentace na odborných setkáních

- **Macíková P.**, Papoušková B., Kučera L., Cankař P., Jirovský D., Maier V., Skopalová J.: *Investigation of electrochemical oxidation of tolterodine and fesoterodine using electrochemistry combined off-line with HPLC/ESI-MS*, 2<sup>nd</sup> International Workshop on Electrochemistry/Mass Spectrometry, Münster, Germany, 22 – 24. 5. 2013, poster.
- **Macíková P.**, Wolrab D., Kohout M., Boras M., Lemr K., Lindner W.: *Optimization of conditions for a new strong cation exchanger in HPLC and comparison of performance in sub-critical fluid chromatography (subFC)*, 29<sup>th</sup> international Symposium on Chromatography, Torun, Poland, 9. – 13. 9. 2012, poster, Book of abstracts, str. 655.
- Skopalová J., **Macíková P.**, Vacek J., Papoušková B., Cankař P., Maier V.: *Electrochemical generation and LC-MS identification of drug oxidation products*, 14<sup>th</sup> International Conference on Electrochemistry, Portorož, Slovenia, 3. – 7. 6. 2012, poster, Book of abstracts, str. 167.
- **Macíková P.**, Halouzka V., Hrbáč J., Barták P., Skopalová J.: *Electrochemical behavior and determination of rutin on variously modified carbon paste electrodes*, 7<sup>th</sup> Aegean Analytical Chemistry Days 2010, Lesvos, Greece, 29. 9. – 3. 10. 2010, poster, Book of abstracts, str. 153.
- **Macíková P.**, Halouzka V., Hrbáč J., Skopalová J.: *Amperometric determination of rutin on carbon paste electrodes*, X. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků, Brno, 23. – 24. 6. 2010, poster, rozšířený abstrakt ve sborníku příspěvků, str. 147-149.
- **Macíková P.**, Skopalová J.: *Srovnání různě modifikovaných uhlíkových pastových elektrod pro stanovení rutinu*, XXX. Moderní elektrochemické metody, Jetřichovice, 24. – 28. 5. 2010, přednáška, článek ve sborníku přednášek, str. 101-105.

# Přílohy

**Příloha 1** Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  tolterodinu ( $C_{22}H_{32}NO$ ,  $m/z = 326,2483$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV s předešlou separací iontu a jeho struktura

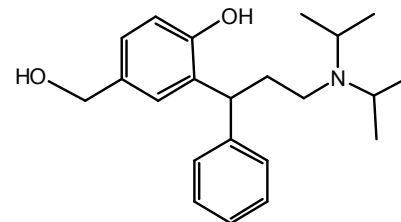
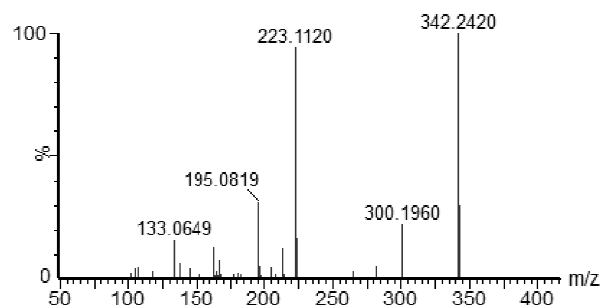
$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
326,2483	-	-	-	-	$C_{22}H_{32}NO$	326,2484	-0,1	-
284,1973	42,0510	$C_3H_6$	4,0	42,0470	$C_{19}H_{26}NO$	284,2014	-4,1	propen
225,1293	101,1190	$C_6H_{15}N$	-1,5	101,1205	$C_{16}H_{17}O$	225,1279	1,4	diisopropylamin
197,0961	129,1522	$C_8H_{19}N$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ )	0,4	129,1518	$C_{14}H_{13}O$	197,0966	-0,5	diisopropylamin, ethen
179,0857	147,1626	$C_8H_{21}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ , $H_2O$ )	0,3	147,1623	$C_{14}H_{11}$	179,0861	-0,4	diisopropylamin, ethen, voda
169,1020	157,1463	$C_9H_{19}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ , CO)	-0,4	157,1467	$C_{13}H_{13}$	169,1017	0,3	diisopropylamin, ethen, oxid uhelnatý
<b>147,0804</b>	<b>179,1679</b>	<b><math>C_{12}H_{21}N</math> (<math>C_6H_{15}N</math>, <math>C_6H_6</math>)</b>	<b>0,5</b>	<b>179,1674</b>	<b><math>C_{10}H_{11}O</math></b>	<b>147,0810</b>	<b>-0,6</b>	<b>diisopropylamin, benzen</b>
121,0643	205,1841	$C_{14}H_{23}N$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_6H_6$ , $C_2H_2$ )	1,0	205,1831	$C_8H_9O$	121,0653	-1,0	diisopropylamin, benzen, ethyn
119,0846	207,1637	$C_{13}H_{21}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_6H_6$ , CO)	1,4	207,1623	$C_9H_{11}$	119,0861	-1,5	diisopropylamin, benzen, oxid uhelnatý
117,0698	209,1785	$C_{13}H_{23}NO$ ( $C_7H_8O$ , $C_6H_{15}N$ )	0,5	209,1780	$C_9H_9$	117,0704	-0,6	diisopropylamin, <i>p</i> -kresol
102,1280	224,1203	$C_{13}H_{16}O$	0,2	224,1201	$C_6H_{16}N$	102,1283	-0,3	4-methyl-2-(1-fenylallyl)fenol
91,0537	235,1946	$C_{15}H_{25}NO$ ( $C_8H_{17}N$ , $C_7H_8O$ )	1,0	235,1936	$C_7H_7$	91,0548	-1,1	<i>N</i> -isopropyl- <i>N</i> -vinylpropan-2-amin, <i>p</i> -kresol
72,0819	254,1664	$C_{18}H_{22}O$ ( $C_{15}H_{16}O$ , $C_3H_6$ )	-0,7	254,1671	$C_4H_{10}N$	72,0813	0,6	4-methyl-2-(1-fenylethyl)fenol, propen
60,0823	266,1660	$C_{19}H_{22}O$ ( $C_{16}H_{16}O$ , $C_3H_6$ )	-1,1	266,1671	$C_3H_{10}N$	60,0813	1,0	4-methyl-2-(1-fenylallyl)fenol, propen



## Příloha 2

Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  5-hydroxymethyltolterodinu ( $C_{22}H_{32}NO_2$ ,  $m/z = 342,2420$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV s předešlou separací iontu a jeho struktura

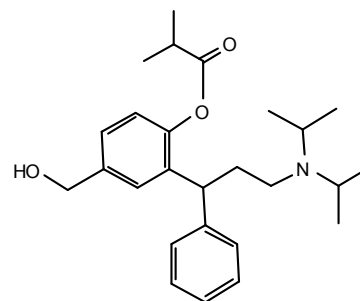
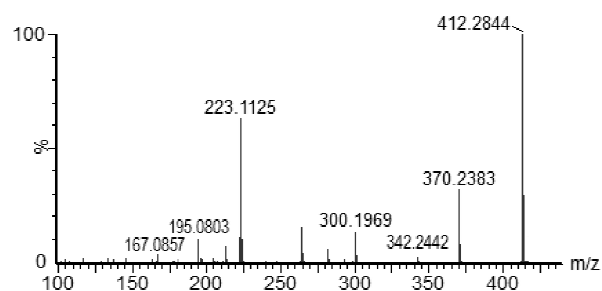
$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
342,2420	-	-	-	-	$C_{22}H_{32}NO_2$	342,2433	-1,3	-
300,1960	42,0460	$C_3H_6$	-0,9	42,0469	$C_{19}H_{26}NO_2$	300,1964	-0,4	propen
<b>223,1120</b>	<b>119,1300</b>	<b><math>C_6H_{17}NO</math> (<math>C_6H_{15}N, H_2O</math>)</b>	<b>-1,0</b>	<b>119,1310</b>	<b><math>C_{16}H_{15}O</math></b>	<b>223,1123</b>	<b>-0,3</b>	<b>diisopropylamin, voda</b>
213,0907	129,1513	$C_8H_{19}N$ ( $C_6H_{15}N, C_2H_4$ )	-0,4	129,1517	$C_{14}H_{13}O_2$	213,0916	-0,9	diisopropylamin, ethen
195,0819	147,1601	$C_8H_{21}NO$ ( $C_6H_{15}N, C_2H_4, H_2O$ )	-2,2	147,1623	$C_{14}H_{11}O$	195,0810	0,9	diisopropylamin, ethen, voda
183,0801	159,1619	$C_9H_{21}NO$ ( $C_6H_{15}N, C_2H_4, CH_2O$ )	-0,4	159,1623	$C_{13}H_{11}O$	183,0810	-0,9	diisopropylamin, ethen, formaldehyd
167,0854	175,1566	$C_9H_{21}NO_2$ ( $C_6H_{15}N, C_2H_4, H_2O, CO$ )	-0,6	175,1572	$C_{13}H_{11}$	167,0861	-0,7	diisopropylamin, ethen, voda, oxid uhelnatý
163,0752	179,1668	$C_{12}H_{21}N$ ( $C_6H_{15}N, C_6H_6$ )	-0,6	179,1674	$C_{10}H_{11}O_2$	163,0759	-0,7	diisopropylamin, benzen
133,0649	209,1771	$C_{13}H_{23}NO$ ( $C_6H_{15}N, C_6H_6, CH_2O$ )	-0,9	209,1780	$C_9H_9O$	133,0653	-0,4	diisopropylamin, benzen, formaldehyd
117,0696	225,1724	$C_{13}H_{23}NO_2$ ( $C_6H_{15}N, C_7H_8O_2$ )	-0,5	225,1729	$C_9H_9$	117,0704	-0,8	diisopropylamin, 4-(hydroxymethyl)fenol
107,0499	235,1921	$C_{15}H_{25}NO$ ( $C_6H_{15}N, C_2H_4, C_6H_6, CO$ )	-1,5	235,1936	$C_7H_7O$	107,0497	0,2	diisopropylamin, ethen, benzen, oxid uhelnatý
105,0697	237,1723	$C_{14}H_{23}NO_2$ ( $C_6H_{15}N, C_6H_6, CH_2O, CO$ )	-0,6	237,1729	$C_8H_9$	105,0704	-0,7	diisopropylamin, benzen, formaldehyd, oxid uhelnatý
105,0336	237,2084	$C_{15}H_{27}NO$ ( $C_{15}H_{25}N, H_2O$ )	-0,9	237,2093	$C_7H_5O$	105,0340	-0,4	<i>N,N</i> -diisopropyl-3-fenylpropan-1-amin, voda
102,1275	240,1145	$C_{16}H_{16}O_2$	-1,3	240,1158	$C_6H_{16}N$	102,1275	0,0	4-(hydroxymethyl)-2-(1-fenylallyl)fenol
91,0542	251,1878	$C_{15}H_{25}NO_2$ ( $C_7H_8O_2, C_8H_{17}N$ )	-0,7	251,1885	$C_7H_7$	91,0548	-0,6	<i>N</i> -isopropyl- <i>N</i> -vinylpropan-2-amin, 4-(hydroxymethyl)fenol
72,0805	270,1615	$C_{18}H_{22}O_2$ ( $C_{15}H_{16}O_2, C_3H_6$ )	-0,5	270,1620	$C_4H_{10}N$	72,0813	-0,8	4-(hydroxymethyl)-2-(1-fenylethyl)fenol, propen



### Příloha 3

Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  fesoterodinu ( $C_{26}H_{38}NO_3$ ,  $m/z = 412,2844$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV s přešlou separací iontu a jeho struktura

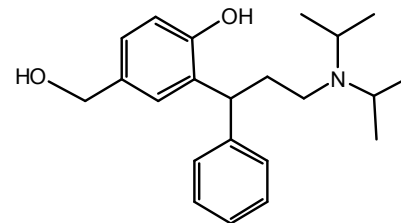
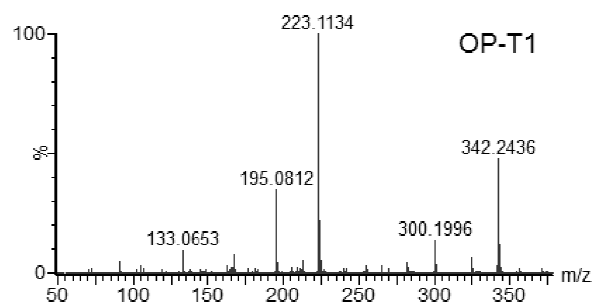
$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
412,2844	-	-	-	-	$C_{26}H_{38}NO_3$	412,2852	-0,8	-
370,2383	42,0461	$C_3H_6$	-0,9	42,0470	$C_{23}H_{32}NO_3$	370,2382	0,1	propen
342,2442	70,0402	$C_4H_6O$ ( $C_3H_6$ , CO)	-1,7	70,0419	$C_{22}H_{32}NO_2$	342,2433	0,9	propen, oxid uhelnatý
300,1969	112,0875	$C_7H_{12}O$ ( $C_3H_6$ , CO, $C_3H_6$ )	-1,3	112,0888	$C_{19}H_{26}NO_2$	300,1964	0,5	propen, oxid uhelnatý, propen
282,1886	130,0958	$C_7H_{14}O_2$ ( $C_3H_6$ , $C_4H_8O_2$ )	-3,6	130,0994	$C_{19}H_{24}NO$	282,1858	2,8	propen, kyselina isomáselná
264,1755	148,1089	$C_7H_{16}O_3$ ( $C_3H_6$ , $C_4H_8O_2$ , $H_2O$ )	-1,1	148,1100	$C_{19}H_{22}N$	264,1752	0,3	propen, kyselina isomáselná, voda
<b>223,1125</b>	<b>189,1719</b>	<b><math>C_{10}H_{23}NO_2</math> (<math>C_6H_{15}N</math>, <math>C_4H_8O_2</math>)</b>	<b>-1,0</b>	<b>189,1729</b>	<b><math>C_{16}H_{15}O</math></b>	<b>223,1123</b>	<b>0,2</b>	<b>diisopropylamin, kyselina isomáselná</b>
213,0913	199,1931	$C_{12}H_{25}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ , $C_3H_6$ , CO)	-0,5	199,1936	$C_{14}H_{13}O_2$	213,0916	-0,3	diisopropylamin, ethen, propen, oxid uhelnatý
195,0803	217,2041	$C_{12}H_{27}NO_2$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ , $C_4H_8O_2$ )	-0,1	217,2042	$C_{14}H_{11}O$	195,0810	-0,7	diisopropylamin, ethen, kyselina isomáselná
167,0857	245,1987	$C_{13}H_{27}NO_3$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ , $C_4H_8O_2$ , CO)	-0,4	245,1991	$C_{13}H_{11}$	167,0861	-0,4	diisopropylamin, ethen, kyselina isomáselná, oxid uhelnatý



## Příloha 4

Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  produktu OP-T1 ( $C_{22}H_{32}NO_2$ ,  $m/z = 342,2436$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV bez předešlé separace iontu a návrh jeho struktury

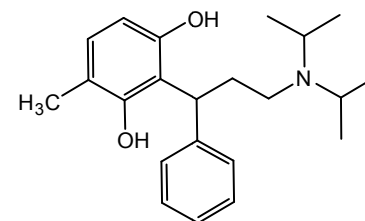
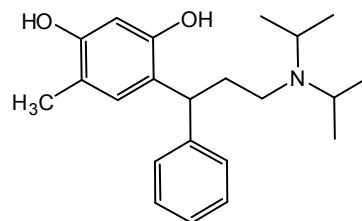
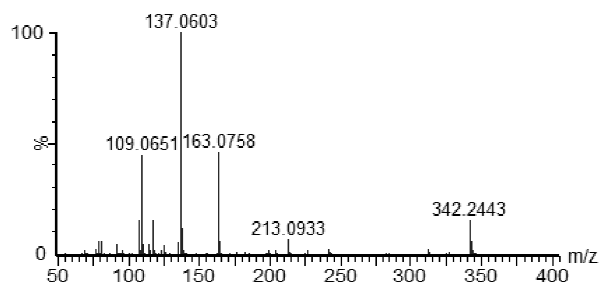
$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
342,2436	-	-	-	-	$C_{22}H_{32}NO_2$	342,2433	0,3	-
300,1996	42,0440	$C_3H_6$	-2,9	42,0469	$C_{19}H_{26}NO_2$	300,1964	3,2	propen
223,1134	119,1302	$C_6H_{17}NO$ ( $C_6H_{15}N, H_2O$ )	-0,8	119,1310	$C_{16}H_{15}O$	223,1123	1,1	diisopropylamin, voda
213,0919	129,1517	$C_8H_{19}N$ ( $C_6H_{15}N, C_2H_4$ )	0,0	129,1517	$C_{14}H_{13}O_2$	213,0916	0,3	diisopropylamin, ethen
195,0812	147,1624	$C_8H_{21}NO$ ( $C_6H_{15}N, C_2H_4, H_2O$ )	0,1	147,1623	$C_{14}H_{11}O$	195,0810	0,2	diisopropylamin, ethen, voda
183,0826	159,1610	$C_9H_{21}NO$ ( $C_6H_{15}N, C_2H_4, CH_2O$ )	-1,3	159,1623	$C_{13}H_{11}O$	183,0810	1,6	diisopropylamin, ethen, formaldehyd
167,0869	175,1567	$C_9H_{21}NO_2$ ( $C_6H_{15}N, C_2H_4, H_2O, CO$ )	-0,5	175,1572	$C_{13}H_{11}$	167,0861	0,8	diisopropylamin, ethen, voda, oxid uhelnatý
163,0766	179,1670	$C_{12}H_{21}N$ ( $C_6H_{15}N, C_6H_6$ )	-0,4	179,1674	$C_{10}H_{11}O_2$	163,0759	0,7	diisopropylamin, benzen
133,0653	209,1783	$C_{13}H_{23}NO$ ( $C_6H_{15}N, C_6H_6, CH_2O$ )	0,3	209,1780	$C_9H_9O$	133,0653	0,0	diisopropylamin, benzen, formaldehyd
107,0494	235,1942	$C_{15}H_{25}NO$ ( $C_6H_{15}N, C_2H_4, C_6H_6, CO$ )	0,6	235,1936	$C_7H_7O$	107,0497	-0,3	diisopropylamin, ethen, benzen, oxid uhelnatý
105,0707	237,1729	$C_{14}H_{23}NO_2$ ( $C_6H_{15}N, C_6H_6, CH_2O, CO$ )	0,0	237,1729	$C_8H_9$	105,0704	0,3	diisopropylamin, benzen, formaldehyd, oxid uhelnatý
105,0349	237,2087	$C_{15}H_{27}NO$ ( $C_{15}H_{25}N, H_2O$ )	-0,6	237,2093	$C_7H_5O$	105,0340	0,9	<i>N,N</i> -diisopropyl-3-fenylpropan-1-amin, voda
102,1288	240,1148	$C_{16}H_{16}O_2$	-1,0	240,1158	$C_6H_{16}N$	102,1275	1,3	4-(hydroxymethyl)-2-(1-fenylallyl)fenol
91,0552	251,1884	$C_{15}H_{25}NO_2$ ( $C_7H_8O_2, C_8H_{17}N$ )	-0,1	251,1885	$C_7H_7$	91,0548	0,4	<i>N</i> -isopropyl- <i>N</i> -vinylpropan-2-amin, 4-(hydroxymethyl)fenol
72,0816	270,1620	$C_{18}H_{22}O_2$ ( $C_{15}H_{16}O_2, C_3H_6$ )	0,0	270,1620	$C_4H_{10}N$	72,0813	0,3	4-(hydroxymethyl)-2-(1-fenylethyl)fenol, propen



## Příloha 5

Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  produktu OP-T2 a OP-T3 ( $C_{22}H_{32}NO_2$ ,  $m/z = 342,2443$ ), jejich hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV s předešlou separací iontu a návrh jejich struktury

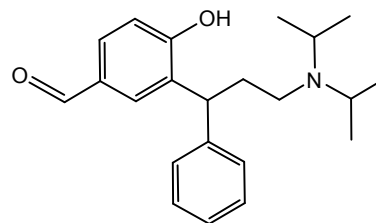
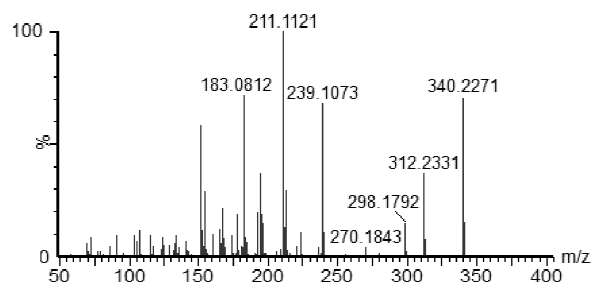
$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
342,2443	-	-	-	-	$C_{22}H_{32}NO_2$	342,2433	1,0	-
241,1224	101,1219	$C_6H_{15}N$	1,5	101,1204	$C_{16}H_{17}O_2$	241,1229	-0,5	diisopropylamin
213,0933	129,1510	$C_8H_{19}N$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ )	-0,7	129,1517	$C_{14}H_{13}O_2$	213,0916	1,7	diisopropylamin, ethen
163,0758	179,1685	$C_{12}H_{21}N$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_6H_6$ )	1,1	179,1674	$C_{10}H_{11}O_2$	163,0759	-0,1	diisopropylamin, benzen
<b>137,0603</b>	<b>205,1840</b>	<b><math>C_{14}H_{23}N</math> (<math>C_6H_{15}N</math>, <math>C_2H_2</math>, <math>C_6H_6</math>)</b>	<b>1,0</b>	<b>205,1830</b>	<b><math>C_8H_9O_2</math></b>	<b>137,0603</b>	<b>0,0</b>	<b>diisopropylamin, benzen, ethyn</b>
117,0699	225,1744	$C_{13}H_{23}NO_2$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_7H_8O_2$ )	1,5	225,1729	$C_9H_9$	117,0704	-0,5	diisopropylamin, 4-methylbenzene-1,3-diol
109,0651	233,1792	$C_{15}H_{23}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_2$ , $C_6H_6$ , CO)	1,2	233,1780	$C_7H_9O$	109,0653	-0,2	diisopropylamin, benzen, ethyn, oxid uhelnatý
107,0492	235,1951	$C_{15}H_{25}NO$ ( $C_{15}H_{23}N$ , $H_2O$ )	1,5	235,1936	$C_7H_7O$	107,0497	-0,5	<i>N,N</i> -diisopropyl-3-fenylprop-2-en-1-amin, voda



## Příloha 6

Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  produktu OP-T4 ( $C_{22}H_{30}NO_2$ ,  $m/z = 340,2271$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV s předešlou separací iontu a návrh jeho struktury

$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
340,2271	-	-	-	-	$C_{22}H_{30}NO_2$	340,2277	-0,6	-
312,2331	27,9940	CO	-1,0	27,9950	$C_{21}H_{30}NO$	312,2327	0,4	oxid uhelnatý
298,1792	42,0479	$C_3H_6$	0,9	42,0470	$C_{19}H_{24}NO_2$	298,1807	-1,5	propen
270,1843	70,0428	$C_4H_6O$ ( $C_3H_6$ , CO)	0,9	70,0419	$C_{18}H_{24}NO$	270,1858	-1,5	propen, oxid uhelnatý
239,1073	101,1198	$C_6H_{15}N$	-0,7	101,1205	$C_{16}H_{15}O_2$	239,1072	0,1	diisopropylamin
<b>211,1121</b>	<b>129,1150</b>	<b><math>C_7H_{15}NO</math> (<math>C_6H_{15}N</math>, CO)</b>	<b>-0,4</b>	<b>129,1154</b>	<b><math>C_{15}H_{15}O</math></b>	<b>211,1123</b>	<b>-0,2</b>	<b>diisopropylamin, oxid uhelnatý</b>
183,0812	157,1459	$C_9H_{19}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ , CO)	-0,8	157,1467	$C_{13}H_{11}O$	183,0810	0,2	diisopropylamin, ethen, oxid uhelnatý
161,0596	179,1675	$C_{12}H_{21}N$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_6H_6$ )	0,1	179,1674	$C_{10}H_9O_2$	161,0603	-0,7	diisopropylamin, benzen
155,0860	185,1411	$C_{10}H_{19}NO_2$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ , 2CO)	-0,5	185,1416	$C_{12}H_{11}$	155,0861	-0,1	diisopropylamin, ethen, 2x oxid uhelnatý
123,0423	217,1848	$C_{15}H_{23}N$	1,7	217,1831	$C_7H_7O_2$	123,0446	-2,3	<i>N,N</i> -diisopropyl-3-fenylprop-2-en-1-amin
117,0702	223,1569	$C_{13}H_{21}NO_2$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_7H_6O_2$ )	-0,4	223,1573	$C_9H_9$	117,0704	-0,2	diisopropylamin, 4-hydroxybenzaldehyd
107,0486	233,1785	$C_{15}H_{23}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_2$ , $C_6H_6$ , CO)	0,5	233,1780	$C_7H_7O$	107,0497	-1,1	diisopropylamin, ethyn, benzen, oxid uhelnatý
105,0697	235,1574	$C_{15}H_{25}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ , $C_6H_6$ , CO)	0,1	235,1573	$C_8H_9$	105,0704	-0,7	diisopropylamin, ethen, benzen, oxid uhelnatý
79,0541	261,173	$C_{16}H_{23}NO_2$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_2$ , $C_6H_6$ , 2CO)	0,1	261,1729	$C_6H_7$	79,0548	-0,7	diisopropylamin, ethyn, benzen, 2x oxid uhelnatý

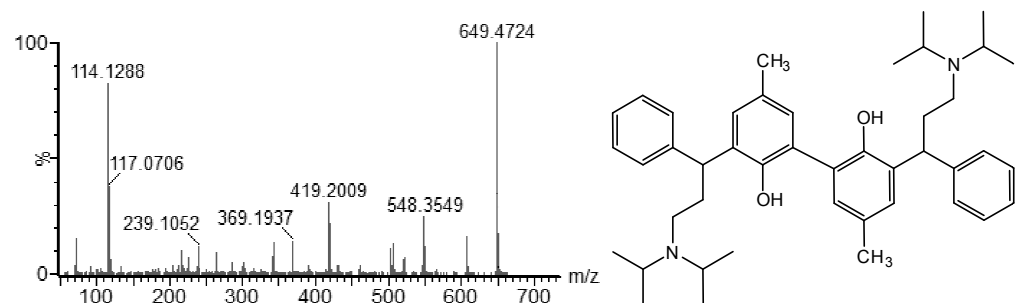




## Příloha 7

Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  produktu OP-T5 ( $C_{44}H_{61}N_2O_2$ ,  $m/z = 649,4724$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV s předešlou separací iontu a návrh jeho struktury

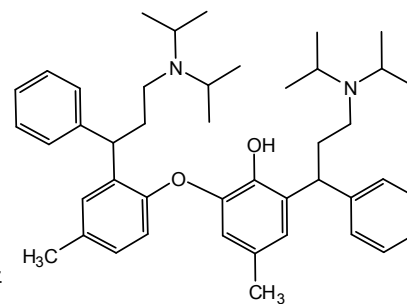
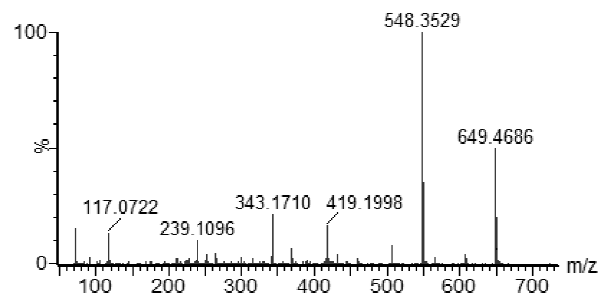
$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
649,4724	-	-	-	-	$C_{44}H_{61}N_2O_2$	649,4733	-0,9	-
607,4125	42,0599	$C_3H_6$	13,0	42,0469	$C_{41}H_{55}N_2O_2$	607,4264	-13,9	propen
548,3549	101,1175	$C_6H_{15}N$	-2,9	101,1204	$C_{38}H_{46}NO_2$	548,3529	2,0	diisopropylamin
506,2983	143,1741	$C_9H_{21}N$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_3H_6$ )	6,7	143,1674	$C_{35}H_{40}NO_2$	506,3059	-7,6	diisopropylamin, propen
419,2009	230,2715	$C_{14}H_{34}N_2$ ( $2C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ )	-0,7	230,2722	$C_{30}H_{27}O_2$	419,2011	-0,2	2x diisopropylamin, ethen
369,1937	280,2787	$C_{18}H_{36}N_2$ ( $2C_6H_{15}N$ , $C_6H_6$ )	-9,1	280,2878	$C_{26}H_{25}O_2$	369,1855	8,2	2x diisopropylamin, benzen
343,1818	306,2906	$C_{20}H_{38}N_2$ ( $2C_6H_{15}N$ , $C_2H_2$ , $C_6H_6$ )	-12,9	306,3035	$C_{24}H_{23}O_2$	343,1698	12,0	2x diisopropylamin, ethyn, benzen
239,1052	410,3672	$C_{28}H_{46}N_2$ ( $2C_6H_{15}N$ , $2C_2H_2$ , $2C_6H_6$ )	1,1	410,3661	$C_{16}H_{15}O_2$	239,1072	-2,0	2x diisopropylamin, 2x ethyn, 2x benzen
117,0706	532,4018	$C_{35}H_{52}N_2O_2$ ( $C_{29}H_{37}NO_2$ , $C_6H_{15}N$ )	-1,1	532,4029	$C_9H_9$	117,0704	0,2	3-(3-(diisopropylamino)-1-fenylpropyl)-5,5'-dimethylbifenyl-2,2'-diol, diisopropylamin
<b>114,1288</b>	<b>535,3436</b>	<b><math>C_{37}H_{45}NO_2</math></b>	<b>-1,4</b>	<b>535,3450</b>	<b><math>C_7H_{16}N</math></b>	<b>114,1283</b>	<b>0,5</b>	<b>3-(3-(diisopropylamino)-1-fenylpropyl)-5,5'-dimethyl-3'-(1-fenylethyl)bifenyl-2,2'-diol</b>



## Příloha 8

Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  produktu OP-T6 ( $C_{44}H_{61}N_2O_2$ ,  $m/z = 649,4686$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV s předešlou separací iontu a návrh jeho struktury

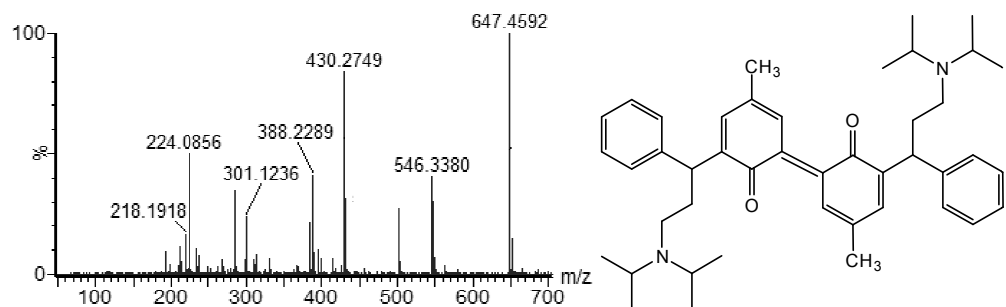
$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
649,4686	-	-	-	-	$C_{44}H_{61}N_2O_2$	649,4733	-4,7	-
607,4231	42,0455	$C_3H_6$	-1,4	42,0469	$C_{41}H_{55}N_2O_2$	607,4264	-3,3	propen
<b>548,3529</b>	<b>101,1157</b>	<b><math>C_6H_{15}N</math></b>	<b>-4,7</b>	<b>101,1204</b>	<b><math>C_{38}H_{46}NO_2</math></b>	<b>548,3529</b>	<b>0,0</b>	<b>diisopropylamin</b>
506,3070	143,1616	$C_9H_{21}N$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_3H_6$ )	-5,8	143,1674	$C_{35}H_{40}NO_2$	506,3059	1,1	diisopropylamin, propen
432,2826	217,1860	$C_{15}H_{23}N$	3,0	217,1830	$C_{29}H_{38}NO_2$	432,2903	-7,7	<i>N,N</i> -diisopropyl-3-fenylprop-2-en-1-amin
419,1998	230,2688	$C_{14}H_{34}N_2$ ( $2C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ )	-3,4	230,2722	$C_{30}H_{27}O_2$	419,2011	-1,3	2x diisopropylamin, ethen
369,1865	280,2821	$C_{18}H_{36}N_2$ ( $2C_6H_{15}N$ , $C_6H_6$ )	-5,7	280,2878	$C_{26}H_{25}O_2$	369,1855	1,0	2x diisopropylamin, benzen
343,1710	306,2976	$C_{20}H_{38}N_2$ ( $2C_6H_{15}N$ , $C_2H_2$ , $C_6H_6$ )	-5,9	306,3035	$C_{24}H_{23}O_2$	343,1698	1,2	2x diisopropylamin, ethyn, benzen
239,1096	410,3590	$C_{28}H_{46}N_2$ ( $2C_6H_{15}N$ , $2C_2H_2$ , $2C_6H_6$ )	-7,1	410,3661	$C_{16}H_{15}O_2$	239,1072	2,4	2x diisopropylamin, 2x ethyn, 2x benzen
117,0722	532,3964	$C_{35}H_{52}N_2O_2$ ( $C_{29}H_{37}NO_2$ , $C_6H_{15}N$ )	-6,5	532,4029	$C_9H_9$	117,0704	1,8	2-(2-(3-(diisopropylamino)-1-fenylpropyl)-4-methylfenoxy)-4-methylfenol, diisopropylamin



## Příloha 9

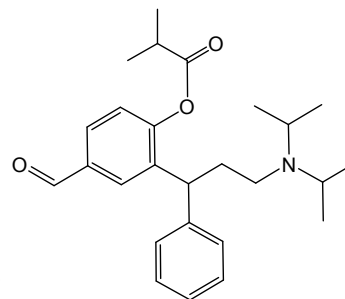
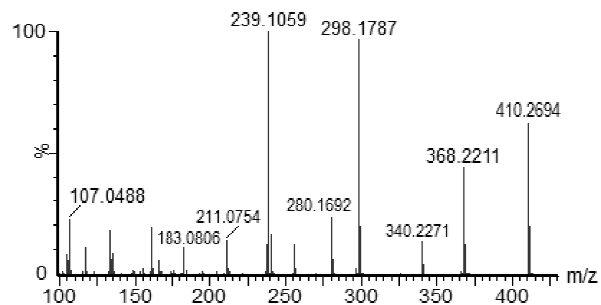
Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  produktu OP-T7 ( $C_{44}H_{59}N_2O_2$ ,  $m/z = 647,4592$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV bez předešlé separace iontu a návrh jeho struktury

$m/z$ $[M+H]^+$	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
647,4592	-	-	-	-	$C_{44}H_{59}N_2O_2$	647,4577	1,5	-
546,3380	101,1212	$C_6H_{15}N$	0,7	101,1205	$C_{38}H_{44}NO_2$	546,3372	0,8	diisopropylamin
<b>430,2749</b>	<b>217,1843</b>	<b><math>C_{15}H_{23}N</math></b>	<b>1,2</b>	<b>217,1831</b>	<b><math>C_{29}H_{36}NO_2</math></b>	<b>430,2746</b>	<b>0,3</b>	<b><i>N,N</i>-diisopropyl-3-fenylprop-2-en-1-amin</b>
388,2289	259,2303	$C_{18}H_{29}N$ ( $C_{15}H_{23}N$ , $C_3H_6$ )	0,3	259,2300	$C_{26}H_{30}NO_2$	388,2277	1,2	<i>N,N</i> -diisopropyl-3-fenylprop-2-en-1-amin, propen
301,1236	346,3356	$C_{23}H_{42}N_2$ ( $C_{15}H_{23}N$ , $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ )	0,8	346,3348	$C_{21}H_{17}O_2$	301,1229	0,7	<i>N,N</i> -diisopropyl-3-fenylprop-2-en-1-amin, diisopropylamin, ethen
218,1918	429,2674	$C_{29}H_{35}NO_2$ ( $C_{15}H_{23}N$ , $C_{14}H_{12}O_2$ )	0,6	429,2668	$C_{15}H_{24}N$	218,1909	0,9	<i>N,N</i> -diisopropyl-3-fenylprop-2-en-1-amin; 4-methyl-6-(3-methyl-6-oxo-2,4-cyklohexadien-1-yliden)-2,4-cyklohexadien-1-on



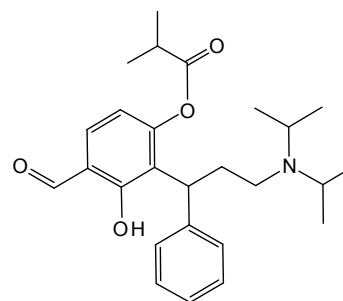
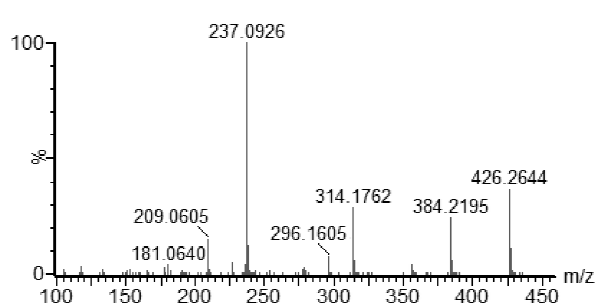
**Příloha 10** Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  produktu OP-F1 ( $C_{26}H_{36}NO_3$ ,  $m/z = 410,2694$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV s předešlou separací iontu a návrh jeho struktury

$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
410,2694	-	-	-	-	$C_{26}H_{36}NO_3$	410,2695	-0,1	-
368,2211	42,0483	$C_3H_6$	1,4	42,0469	$C_{23}H_{30}NO_3$	368,2226	-1,5	propen
340,2271	70,0423	$C_4H_6O$ ( $C_3H_6$ , CO)	0,5	70,0418	$C_{22}H_{30}NO_2$	340,2277	-0,6	propen, oxid uhelnatý
298,1787	112,0907	$C_7H_{12}O$ ( $2C_3H_6$ , CO)	1,9	112,0888	$C_{19}H_{24}NO_2$	298,1807	-2,0	2x propen, oxid uhelnatý
280,1692	130,1002	$C_7H_{14}O_2$ ( $C_3H_6$ , $C_4H_8O_2$ )	0,8	130,0994	$C_{19}H_{22}NO$	280,1701	-0,9	propen, kyselina isomáselná
256,1328	154,1366	$C_{10}H_{18}O$ ( $3C_3H_6$ , CO)	0,9	154,1357	$C_{16}H_{18}NO_2$	256,1338	-1,0	3x propen, oxid uhelnatý
<b>239,1059</b>	<b>171,1635</b>	<b><math>C_{10}H_{21}NO</math> (<math>C_6H_{15}N</math>, <math>C_3H_6</math>, CO)</b>	<b>1,2</b>	<b>171,1623</b>	<b><math>C_{16}H_{15}O_2</math></b>	<b>239,1072</b>	<b>-1,3</b>	<b>diisopropylamin, propen, oxid uhelnatý</b>
211,0754	199,1940	$C_{12}H_{25}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_3H_6$ , CO, $C_2H_4$ )	0,4	199,1936	$C_{14}H_{11}O_2$	211,0759	-0,5	diisopropylamin, propen, oxid uhelnatý, ethen
183,0806	227,1888	$C_{13}H_{25}NO_2$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_3H_6$ , 2CO, $C_2H_4$ )	0,3	227,1885	$C_{13}H_{11}O$	183,0810	-0,4	diisopropylamin, propen, 2x oxid uhelnatý, ethen
161,0592	249,2102	$C_{16}H_{27}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_3H_6$ , CO, $C_6H_6$ )	1,0	249,2092	$C_{10}H_9O_2$	161,0603	-1,1	diisopropylamin, propen, oxid uhelnatý, benzen
133,0644	277,2050	$C_{17}H_{27}NO_2$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_3H_6$ , 2CO, $C_6H_6$ )	0,8	277,2042	$C_9H_9O$	133,0653	-0,9	diisopropylamin, propen, 2x oxid uhelnatý, benzen
117,0693	293,2001	$C_{17}H_{27}NO_3$ ( $C_{11}H_{12}O_3$ , $C_6H_{15}N$ )	1,0	293,1991	$C_9H_9$	117,0704	-1,1	4-formylfenyl isobutyrát, diisopropylamin
107,0488	303,2206	$C_{19}H_{29}NO_2$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_3H_6$ , 2CO, $C_2H_2$ , $C_6H_6$ )	0,8	303,2198	$C_7H_7O$	107,0497	-0,9	diisopropylamin, propen, 2x oxid uhelnatý, ethyn, benzen



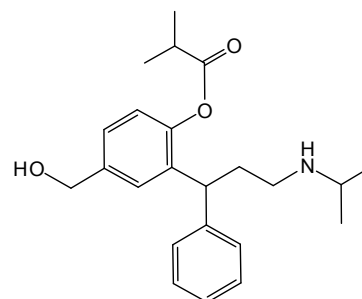
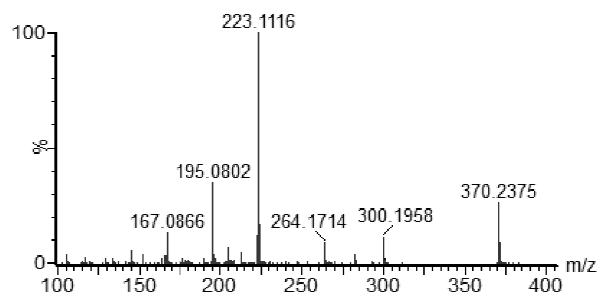
**Příloha 11** Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  produktu OP-F2 ( $C_{26}H_{36}NO_4$ ,  $m/z = 426,2644$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV s předešlou separací iontu a návrh jeho struktury

$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
426,2644	-	-	-	-	$C_{26}H_{36}NO_4$	426,2644	0,0	-
384,2195	42,0449	$C_3H_6$	-2,0	42,0469	$C_{23}H_{30}NO_4$	384,2175	2,0	propen
356,2332	70,0312	$C_4H_6O$ ( $C_3H_6$ , CO)	-10,6	70,0418	$C_{22}H_{30}NO_3$	356,2226	10,6	propen, oxid uhelnatý
314,1762	112,0882	$C_7H_{12}O$ ( $2C_3H_6$ , CO)	-0,6	112,0888	$C_{19}H_{24}NO_3$	314,1756	0,6	2x propen, oxid uhelnatý
296,1605	130,1039	$C_7H_{14}O_2$ ( $C_3H_6$ , $C_4H_8O_2$ )	4,6	130,0993	$C_{19}H_{22}NO_2$	296,1651	-4,6	propen, kyselina isomáselná
<b>237,0926</b>	<b>189,1718</b>	<b><math>C_{10}H_{23}NO_2</math> (<math>C_6H_{15}N</math>, <math>C_4H_8O_2</math>)</b>	<b>-1,0</b>	<b>189,1728</b>	<b><math>C_{16}H_{13}O_2</math></b>	<b>237,0916</b>	<b>1,0</b>	<b>diisopropylamin, kyselina isomáselná</b>
227,0701	199,1943	$C_{12}H_{25}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ , $C_3H_6$ , CO)	0,7	199,1936	$C_{14}H_{11}O_3$	227,0708	-0,7	diisopropylamin, ethen, propen, oxid uhelnatý
209,0605	217,2039	$C_{12}H_{27}NO_2$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ , $C_4H_8O_2$ )	-0,2	217,2041	$C_{14}H_9O_2$	209,0603	0,2	diisopropylamin, ethen, kyselina isomáselná
181,0640	245,2004	$C_{13}H_{27}NO_3$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ , $C_4H_8O_2$ , CO)	1,3	245,1991	$C_{13}H_9O$	181,0653	-1,3	diisopropylamin, ethen, kyselina isomáselná, oxid uhelnatý
153,0682	273,1962	$C_{14}H_{27}NO_4$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ , $C_4H_8O_2$ , 2CO)	2,2	273,1940	$C_{12}H_9$	153,0704	-2,2	diisopropylamin, ethen, kyselina isomáselná, 2x oxid uhelnatý
117,0740	309,1904	$C_{17}H_{27}NO_4$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_{11}H_{12}O_4$ )	-3,6	309,1940	$C_9H_9$	117,0704	3,6	diisopropylamin, 4-formyl-3-hydroxyfenyl isobutyrát



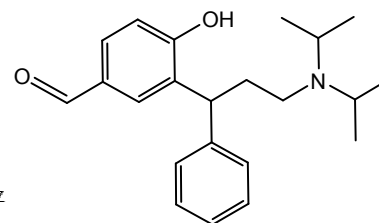
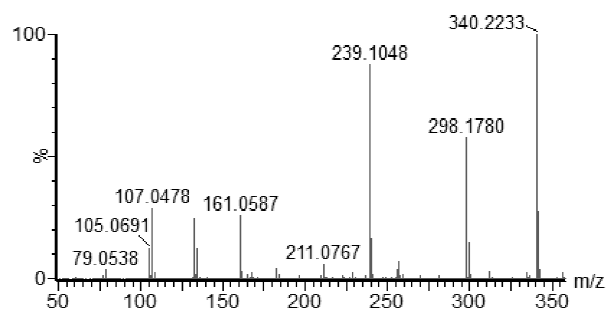
**Příloha 12** Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  produktu OP-F3 ( $C_{23}H_{32}NO_3$ ,  $m/z = 370,2375$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV s předešlou separací iontu a návrh jeho struktury

$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
370,2375	-	-	-	-	$C_{23}H_{32}NO_3$	370,2382	-0,7	-
300,1958	70,0417	$C_4H_6O$ ( $C_3H_6$ , CO)	-0,1	70,0418	$C_{19}H_{26}NO_2$	300,1964	-0,6	propen, oxid uhelnatý
282,1913	88,0462	$C_4H_8O_2$	-6,2	88,0524	$C_{19}H_{24}NO$	282,1858	5,5	kyselina isomáselná
264,1714	106,0661	$C_4H_{10}O_3$ ( $C_4H_8O_2$ , $H_2O$ )	0,4	106,0657	$C_{19}H_{22}N$	264,1725	-1,1	kyselina isomáselná, voda
<b>223,1116</b>	<b>147,1259</b>	<b><math>C_7H_{17}NO_2</math> (<math>C_4H_8O_2</math>, <math>C_3H_9N</math>)</b>	<b>0,0</b>	<b>147,1259</b>	<b><math>C_{16}H_{15}O</math></b>	<b>223,1123</b>	<b>-0,7</b>	<b>kyselina isomáselná, propan-2-amin</b>
205,1008	165,1367	$C_7H_{19}NO_3$ ( $C_4H_8O_2$ , $C_3H_9N$ , $H_2O$ )	0,2	165,1365	$C_{16}H_{13}$	205,1017	-0,9	kyselina isomáselná, propan-2-amin, voda
195,0802	175,1573	$C_9H_{21}NO_2$ ( $C_4H_8O_2$ , $C_3H_9N$ , $C_2H_4$ )	0,1	175,1572	$C_{14}H_{11}O$	195,0810	-0,8	kyselina isomáselná, propan-2-amin, ethen
167,0866	203,1509	$C_{10}H_{21}NO_3$ ( $C_4H_8O_2$ , $C_3H_9N$ , $C_2H_4$ , CO)	-1,2	203,1521	$C_{13}H_{11}$	167,0861	0,5	kyselina isomáselná, propan-2-amin, ethen, oxid uhelnatý
145,0664	225,1711	$C_{13}H_{23}NO_2$ ( $C_4H_8O_2$ , $C_3H_9N$ , $C_6H_6$ )	-1,8	225,1729	$C_{10}H_9O$	145,0653	1,1	kyselina isomáselná, propan-2-amin, benzen
117,0710	253,1665	$C_{14}H_{23}NO_3$ ( $C_4H_8O_2$ , $C_3H_9N$ , $C_6H_6$ , CO)	-1,3	253,1678	$C_9H_9$	117,0704	0,6	kyselina isomáselná, propan-2-amin, benzen, oxid uhelnatý
105,0362	265,2013	$C_{16}H_{27}NO_2$ ( $C_4H_8O_2$ , $C_3H_9N$ , $C_2H_2$ , $C_7H_8$ )	-2,9	265,2042	$C_7H_5O$	105,0340	2,2	kyselina isomáselná, propan-2-amin, ethyn, toluen



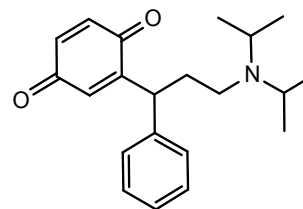
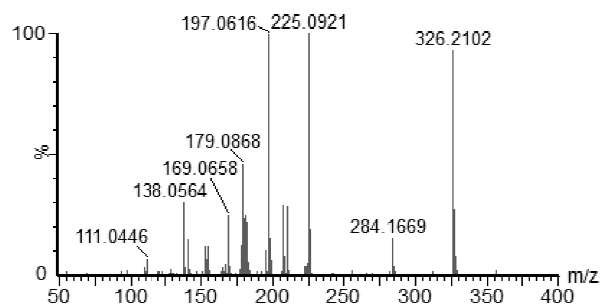
**Příloha 13** Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  produktu OP-H1 ( $C_{22}H_{30}NO_2$ ,  $m/z = 340,2233$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV bez předešlé separace iontu a návrh jeho struktury

$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
340,2233	-	-	-	-	$C_{22}H_{30}NO_2$	340,2277	-4,4	-
312,2338	27,9895	CO	-5,5	27,9950	$C_{21}H_{30}NO$	312,2327	1,1	oxid uhelnatý
298,1780	42,0453	$C_3H_6$	-1,7	42,0470	$C_{19}H_{24}NO_2$	298,1807	-2,7	propen
270,1859	70,0374	$C_4H_6O$ ( $C_3H_6$ , CO)	-4,5	70,0419	$C_{18}H_{24}NO$	270,1858	0,1	propen, oxid uhelnatý
<b>239,1048</b>	<b>101,1185</b>	<b><math>C_6H_{15}N</math></b>	<b>-2,0</b>	<b>101,1205</b>	<b><math>C_{16}H_{15}O_2</math></b>	<b>239,1072</b>	<b>-2,4</b>	<b>diisopropylamin</b>
211,1136	129,1097	$C_7H_{15}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , CO)	-5,7	129,1154	$C_{15}H_{15}O$	211,1123	1,3	diisopropylamin, oxid uhelnatý
183,0795	157,1438	$C_9H_{19}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ , CO)	-2,9	157,1467	$C_{13}H_{11}O$	183,0810	-1,5	diisopropylamin, ethen, oxid uhelnatý
161,0587	179,1646	$C_{12}H_{21}N$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_6H_6$ )	-2,8	179,1674	$C_{10}H_9O_2$	161,0603	-1,6	diisopropylamin, benzen
133,0633	207,1600	$C_{13}H_{21}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_6H_6$ , CO)	-2,4	207,1624	$C_9H_9O$	133,0653	-2,0	diisopropylamin, benzen, oxid uhelnatý
107,0478	233,1755	$C_{15}H_{23}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_2$ , $C_6H_6$ , CO)	-2,5	233,1780	$C_7H_7O$	107,0497	-1,9	diisopropylamin, ethyn, benzen, oxid uhelnatý
105,0691	235,1542	$C_{15}H_{25}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ , $C_6H_6$ , CO)	-3,1	235,1573	$C_8H_9$	105,0704	-1,3	diisopropylamin, ethen, benzen, oxid uhelnatý
79,0538	261,1695	$C_{16}H_{23}NO_2$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_2$ , $C_6H_6$ , 2CO)	-3,4	261,1729	$C_6H_7$	79,0548	-1,0	diisopropylamin, ethyn, benzen, 2x oxid uhelnatý



**Příloha 14** Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  produktu OP-H2 ( $C_{21}H_{28}NO_2$ ,  $m/z = 326,2102$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV bez předešlé separace iontu a návrh jeho struktury

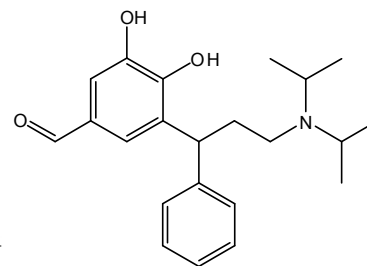
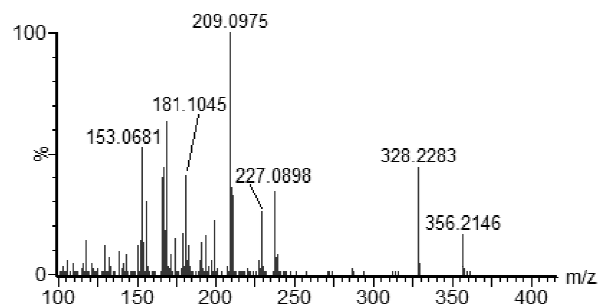
$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
326,2102	-	-	-	-	$C_{21}H_{28}NO_2$	326,2120	-1,8	-
284,1669	42,0433	$C_3H_6$	-3,6	42,0469	$C_{18}H_{22}NO_2$	284,1651	1,8	propen
<b>225,0921</b>	<b>101,1181</b>	<b><math>C_6H_{15}N</math></b>	<b>-2,3</b>	<b>101,1204</b>	<b><math>C_{15}H_{13}O_2</math></b>	<b>225,0916</b>	<b>0,5</b>	<b>diisopropylamin</b>
<b>197,0616</b>	<b>129,1486</b>	<b><math>C_8H_{19}N</math> (<math>C_6H_{15}N</math>, <math>C_2H_4</math>)</b>	<b>-3,1</b>	<b>129,1517</b>	<b><math>C_{13}H_9O_2</math></b>	<b>197,0603</b>	<b>1,3</b>	<b>diisopropylamin, ethen</b>
179,0868	147,1234	$C_7H_{17}NO_2$ ( $C_6H_{15}N$ , CO, $H_2O$ )	-1,5	147,1249	$C_{14}H_{11}$	179,0871	-0,3	diisopropylamin, oxid uhelnatý, voda
169,0658	157,1444	$C_9H_{19}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ , CO)	-2,3	157,1467	$C_{12}H_9O$	169,0653	0,5	diisopropylamin, ethen, oxid uhelnatý
141,0708	185,1394	$C_{10}H_{19}NO_2$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ , 2CO)	-2,2	185,1416	$C_{11}H_9$	141,0704	0,4	diisopropylamin, ethen, 2x oxid uhelnatý
111,0446	215,1656	$C_{15}H_{21}N$	-1,8	215,1674	$C_6H_7O_2$	111,0446	0,0	<i>N,N</i> -diisopropyl-3-fenylprop-2-yn-1-amin
109,0297	217,1805	$C_{15}H_{23}N$	-2,5	217,1830	$C_6H_5O_2$	109,0290	0,7	<i>N,N</i> -diisopropyl-3-fenylprop-2-en-1-amin





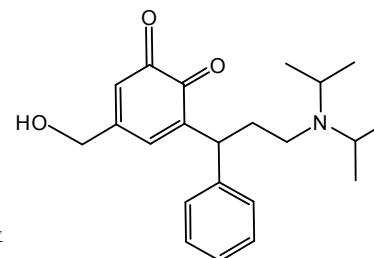
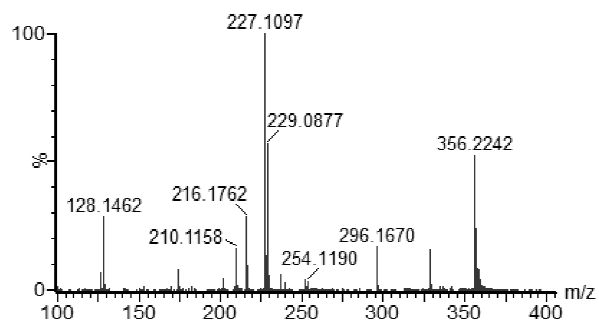
**Příloha 15** Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  produktu OP-H3 ( $C_{22}H_{30}NO_3$ ,  $m/z = 356,2146$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV s předešlou separací iontu a návrh jeho struktury

$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
356,2146	-	-	-	-	$C_{22}H_{30}NO_3$	356,2199	-5,3	-
328,2283	27,9863	CO	-5,9	27,9922	$C_{21}H_{30}NO_2$	328,2277	0,6	oxid uhelnatý
237,0898	119,1248	$C_6H_{17}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $H_2O$ )	-3,5	119,1283	$C_{16}H_{13}O_2$	237,0916	-1,8	diisopropylamin, voda
229,0866	127,1280	$C_8H_{19}N$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ )	-5,4	127,1334	$C_{14}H_{13}O_3$	229,0865	0,1	diisopropylamin, ethen
227,0898	129,1248	$C_7H_{15}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , CO)	12,1	129,1127	$C_{15}H_{15}O_2$	227,1072	-17,4	diisopropylamin, oxid uhelnatý
<b>209,0975</b>	<b>147,1171</b>	<b><math>C_7H_{17}NO_2</math> (<math>C_6H_{15}N</math>, CO, <math>H_2O</math>)</b>	<b>-6,2</b>	<b>147,1233</b>	<b><math>C_{15}H_{13}O</math></b>	<b>209,0966</b>	<b>0,9</b>	<b>diisopropylamin, oxid uhelnatý, voda</b>
199,1110	157,1036	$C_8H_{15}NO_2$ ( $C_6H_{15}N$ , 2CO)	-4,0	157,1076	$C_{14}H_{15}O$	199,1123	-1,3	diisopropylamin, 2x oxid uhelnatý
191,0830	165,1316	$C_7H_{19}NO_3$ ( $C_6H_{15}N$ , CO, 2 $H_2O$ )	-2,2	165,1338	$C_{15}H_{11}$	191,0861	-3,1	diisopropylamin, 2x voda, oxid uhelnatý
181,1045	175,1101	$C_8H_{17}NO_3$ ( $C_6H_{15}N$ , 2CO, $H_2O$ )	-8,1	175,1182	$C_{14}H_{13}$	181,1017	2,8	diisopropylamin, 2x oxid uhelnatý, voda
181,0588	175,1558	$C_9H_{21}NO_2$ ( $C_6H_{15}N$ , CO, $H_2O$ , $C_2H_4$ )	1,2	175,1546	$C_{14}H_{13}$	181,0653	-6,5	diisopropylamin, oxid uhelnatý, voda, ethen
165,0704	191,1442	$C_9H_{21}NO_3$ ( $C_6H_{15}N$ , CO, 2 $H_2O$ , $C_2H_2$ )	-5,3	191,1495	$C_{13}H_9$	165,0704	0,0	diisopropylamin, oxid uhelnatý, 2x voda, ethyn
153,0681	203,1465	$C_{10}H_{21}NO_3$ ( $C_6H_{15}N$ , 2CO, $H_2O$ , $C_2H_4$ )	-3,0	203,1495	$C_{12}H_9$	153,0704	-2,3	diisopropylamin, 2x oxid uhelnatý, voda, ethen
117,0685	239,1461	$C_{13}H_{21}NO_3$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_7H_6O_3$ )	-3,4	239,1495	$C_9H_9$	117,0704	-1,9	diisopropylamin, 3,4-dihydroxybenzaldehyd
109,0291	247,1855	$C_{16}H_{23}NO$ ( $C_{15}H_{23}N$ , CO)	-5,4	247,1909	$C_6H_5O_2$	109,0290	0,1	<i>N,N</i> -diisopropyl-3-fenylprop-2-en-1-amin, oxid uhelnatý



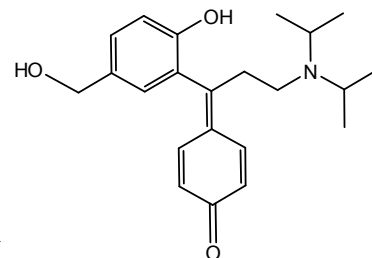
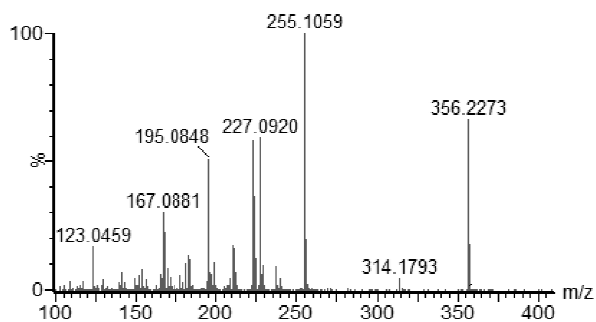
**Příloha 16** Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  produktu OP-H4 ( $C_{22}H_{30}NO_3$ ,  $m/z = 356,2242$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 5–15 eV s předešlou separací iontu a návrh jeho struktury

$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
356,2242	-	-	-	-	$C_{22}H_{30}NO_3$	356,2226	1,6	-
328,2258	27,9940	CO	-0,9	27,9949	$C_{21}H_{30}NO_2$	328,2277	-1,9	oxid uhelnatý
296,1670	60,0528	$C_2H_4O_2$ (CO, $CH_3OH$ )	-4,7	60,0575	$C_{19}H_{22}NO_2$	296,1651	1,9	oxid uhelnatý, methanol
254,1190	102,1008	$C_5H_{10}O_2$ (CO, $CH_3OH$ , $C_3H_6$ )	-3,7	102,1045	$C_{16}H_{16}NO_2$	254,1181	0,9	oxid uhelnatý, methanol, propen
229,0877	127,1321	$C_8H_{19}N$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ )	-4,0	127,1361	$C_{14}H_{13}O_3$	229,0865	1,2	<i>N</i> -isopropyl- <i>N</i> -vinylpropan-2-amin
<b>227,1097</b>	<b>129,1101</b>	<b><math>C_7H_{15}NO</math> (<math>C_6H_{15}N</math>, CO)</b>	<b>-5,3</b>	<b>129,1154</b>	<b><math>C_{15}H_{15}O_2</math></b>	<b>227,1072</b>	<b>2,5</b>	<b>diisopropylamin, oxid uhelnatý</b>
216,1762	140,0436	$C_7H_8O_3$ (2CO, $C_3H_6O$ , $C_2H_2$ )	-3,8	140,0474	$C_{15}H_{22}N$	216,1752	1,0	2x oxid uhelnatý, prop-2-en-1-ol, ethyn
174,1315	182,0883	$C_{10}H_{14}O_3$ (2CO, $C_3H_6O$ , $C_2H_2$ , $C_3H_6$ )	-6,0	182,0943	$C_{12}H_{16}N$	174,1283	3,2	2x oxid uhelnatý, prop-2-en-1-ol, ethyn, propen
153,0573	203,1625	$C_{14}H_{21}N$ ( $C_8H_{15}N$ , $C_6H_6$ )	-4,9	203,1674	$C_8H_9O_3$	153,0552	2,1	<i>N</i> -ethynyl- <i>N</i> -isopropylpropan-2-amin, benzen
139,0386	217,1812	$C_{15}H_{23}N$	-1,9	217,1831	$C_7H_7O_3$	139,0395	-0,9	<i>N,N</i> -diisopropyl-3-fenylprop-2-en-1-amin
128,1462	228,0736	$C_{14}H_{12}O_3$	-5,1	228,0787	$C_8H_{18}N$	128,1439	2,3	3-benzyl-5-(hydroxymethyl)cyklohex-3,5-diene-1,2-dion



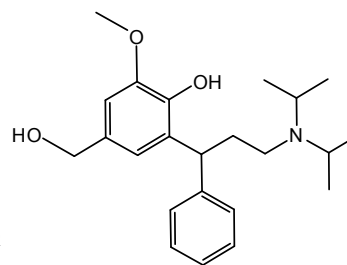
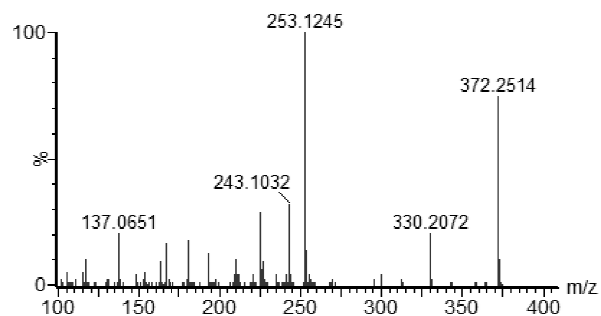
**Příloha 17** Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  produktu OP-H5 ( $C_{22}H_{30}NO_3$ ,  $m/z = 356,2273$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV s předešlou separací iontu a návrh jeho struktury

$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
356,2273	-	-	-	-	$C_{22}H_{30}NO_3$	356,2226	4,7	-
314,1793	42,0491	$C_3H_6$	2,1	42,0470	$C_{19}H_{24}NO_3$	314,1756	3,7	propen
<b>255,1059</b>	<b>101,1225</b>	<b><math>C_6H_{15}N</math></b>	<b>2,0</b>	<b>101,1205</b>	<b><math>C_{16}H_{15}O_3</math></b>	<b>255,1021</b>	<b>3,8</b>	<b>diisopropylamin</b>
237,0944	119,1340	$C_6H_{17}NO$ ( $C_6H_{15}N, H_2O$ )	3,0	119,1310	$C_{16}H_{13}O_2$	237,0916	2,8	diisopropylamin, voda
227,0920	129,1364	$C_8H_{19}N$ ( $C_6H_{15}N, C_2H_4$ )	8,4	129,1280	$C_{14}H_{13}NO_2$	227,0946	-2,6	diisopropylamin, ethyn
223,0810	133,1474	$C_7H_{19}NO$ ( $C_6H_{15}N, CH_3OH$ )	0,7	133,1467	$C_{15}H_{11}O_2$	223,0759	5,1	diisopropylamin, methanol
211,0795	145,1489	$C_8H_{19}NO$ ( $C_6H_{15}N, H_2O, C_2H_2$ )	2,2	145,1467	$C_{14}H_{11}O_2$	211,0759	3,6	diisopropylamin, voda, ethyn
195,0848	161,1436	$C_8H_{19}NO_2$ ( $C_6H_{15}N, CH_3OH, CO$ )	2,0	161,1416	$C_{14}H_{11}O$	195,0810	3,8	diisopropylamin, methanol, oxid uhelnatý
183,0843	173,1441	$C_9H_{19}NO_2$ ( $C_6H_{15}N, H_2O, CO, C_2H_2$ )	2,5	173,1416	$C_{13}H_{11}O$	183,0810	3,3	diisopropylamin, voda, ethyn, oxid uhelnatý
167,0881	189,1403	$C_9H_{19}NO_3$ ( $C_6H_{15}N, CH_3OH, 2CO$ )	3,8	189,1365	$C_{13}H_{11}$	167,0861	2,0	diisopropylamin, methanol, 2x oxid uhelnatý
141,0676	215,1608	$C_{11}H_{21}NO_3$ ( $C_6H_{15}N, CH_3OH, 2CO, C_2H_2$ )	8,6	215,1522	$C_{11}H_9$	141,0704	-2,8	diisopropylamin, methanol, 2x oxid uhelnatý, ethyn
123,0459	233,1825	$C_{15}H_{23}NO$ ( $C_6H_{15}N, CO, C_2H_2, C_6H_6$ )	4,5	233,1780	$C_7H_7O_2$	123,0446	1,3	diisopropylamin, oxid uhelnatý, ethyn, fulven
105.0356	251.1928	$C_{15}H_{25}NO_2$ ( $C_6H_{15}N, C_2H_2, C_7H_8O_2$ )	4,2	251.1886	$C_7H_5O$	105.0340	1,6	diisopropylamin, ethyn, 4-(hydroxymethyl)fenol



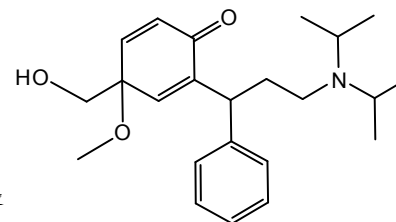
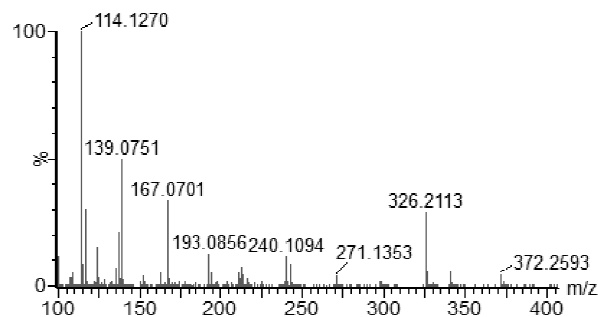
**Příloha 18** Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  produktu OP-H6A ( $C_{23}H_{34}NO_3$ ,  $m/z = 372,2514$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV s předešlou separací iontu a návrh jeho struktury

$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
372,2514	-	-	-	-	$C_{23}H_{34}NO_3$	372,2539	-2,5	-
330,2072	42,0442	$C_3H_6$	-2,8	42,0470	$C_{20}H_{28}NO_3$	330,2069	0,3	propen
312,1844	60,0670	$C_3H_8O$ ( $C_3H_6$ , $H_2O$ )	9,5	60,0575	$C_{20}H_{26}NO_2$	312,1964	-12,0	propen, voda
300,1867	72,0647	$C_4H_8O$ ( $C_3H_6$ , $CH_2O$ )	7,2	72,0575	$C_{19}H_{26}NO_2$	300,1964	-9,7	propen, formaldehyd
<b>253,1245</b>	<b>119,1269</b>	<b><math>C_6H_{17}NO</math> (<math>C_6H_{15}N</math>, <math>H_2O</math>)</b>	<b>-4,1</b>	<b>119,1310</b>	<b><math>C_{17}H_{17}O_2</math></b>	<b>253,1229</b>	<b>1,6</b>	<b>diisopropylamin, voda</b>
243,1032	129,1482	$C_8H_{19}N$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ )	-3,6	129,1518	$C_{15}H_{15}O_3$	243,1021	1,1	diisopropylamin, ethen
225,0919	147,1595	$C_8H_{21}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $H_2O$ , $C_2H_4$ )	-2,8	147,1623	$C_{15}H_{13}O_2$	225,0916	0,3	diisopropylamin, voda, ethen
193,0980	179,1534	$C_8H_{21}NO_3$ ( $C_6H_{15}N$ , $H_2O$ , $2CH_2O$ )	1,2	179,1522	$C_{15}H_{13}$	193,1017	-3,7	diisopropylamin, voda, 2x formaldehyd
181,0678	191,1836	$C_{10}H_{25}NO_2$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ , $CH_2O$ , $CH_3OH$ )	-5,0	191,1886	$C_{13}H_9O$	181,0653	2,5	diisopropylamin, ethen, formaldehyd, methanol
167,0745	205,1769	$C_{14}H_{23}N$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_6H_6$ , $C_2H_2$ )	-6,2	205,1831	$C_9H_{11}O_3$	167,0708	3,7	diisopropylamin, benzen, ethyn
163,0776	209,1738	$C_{13}H_{23}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_6H_6$ , $CH_2O$ )	-4,2	209,1780	$C_{10}H_{11}O_2$	163,0759	1,7	diisopropylamin, benzen, formaldehyd
137,0651	235,1863	$C_{15}H_{25}NO$ ( $C_{15}H_{23}N$ , $H_2O$ )	-7,3	235,1936	$C_8H_9O_2$	137,0603	4,8	<i>N,N</i> -diisopropyl-3-fenylprop-2-en-1-amin, voda
117,0726	255,1788	$C_{14}H_{25}NO_3$ ( $C_8H_{10}O_3$ , $C_6H_{15}N$ )	-4,7	255,1835	$C_9H_9$	117,0704	2,2	4-(hydroxymethyl)-2-methoxyphenol, diisopropylamin
105,0330	267,2184	$C_{16}H_{27}NO_2$ ( $C_{15}H_{23}N$ , $H_2O$ , $CH_2O$ )	-1,5	267,2199	$C_7H_5O$	105,0340	-1,0	<i>N,N</i> -diisopropyl-3-fenylprop-2-en-1-amin, voda, formaldehyd



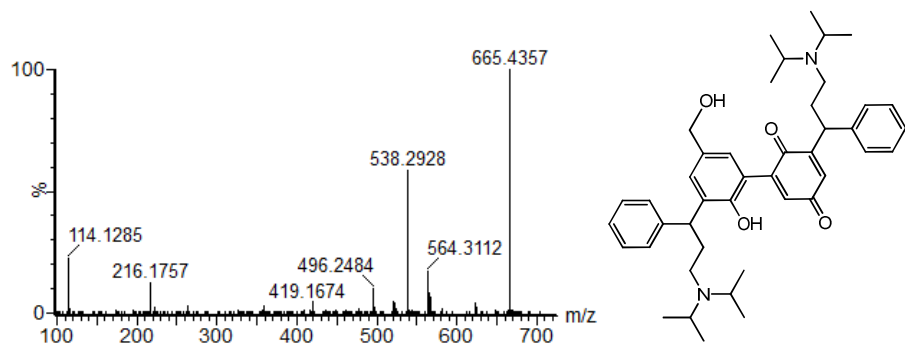
**Příloha 19** Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  produktu OP-H6B ( $C_{23}H_{34}NO_3$ ,  $m/z = 372,2593$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV s předešlou separací iontu a návrh jeho struktury

$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
372,2593	-	-	-	-	$C_{23}H_{34}NO_3$	372,2539	5,4	-
342,2484	30,0109	CH <sub>2</sub> O	0,3	30,0106	$C_{22}H_{32}NO_2$	342,2433	5,1	formaldehyd
341,2384	31,0209	CH <sub>3</sub> O*	2,5	31,0184	$C_{22}H_{31}NO_2$	341,2355	2,9	methoxylový radikál
326,2113	46,0480	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O (H <sub>2</sub> O, C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> )	6,1	46,0419	$C_{21}H_{28}NO_2$	326,2120	-0,7	voda, ethen
271,1353	101,1240	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N	3,5	101,1205	$C_{17}H_{19}O_3$	271,1334	1,9	diisopropylamin
243,1018	129,1575	C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> N (C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N, C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> )	5,7	129,1518	$C_{15}H_{15}O_3$	243,1021	-0,3	diisopropylamin, ethen
240,1094	132,1499	C <sub>7</sub> H <sub>18</sub> NO* (C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N, CH <sub>3</sub> O*)	11,0	132,1389	$C_{16}H_{16}O_2$	240,1150	-5,6	diisopropylamin, methoxylový radikál
225,0945	147,1648	C <sub>8</sub> H <sub>21</sub> NO (C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N, H <sub>2</sub> O, C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> )	2,5	147,1623	$C_{15}H_{13}O_2$	225,0916	2,9	diisopropylamin, voda, ethen
213,0900	159,1693	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> NO (C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N, CH <sub>2</sub> O, C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> )	7,0	159,1623	$C_{14}H_{13}O_2$	213,0916	-1,6	diisopropylamin, formaldehyd, ethen
193,0856	179,1737	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N (C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N, C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> )	6,3	179,1674	$C_{11}H_{13}O_3$	193,0865	-0,9	diisopropylamin, benzen
167,0701	205,1892	C <sub>14</sub> H <sub>23</sub> N (C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N, C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> )	6,1	205,1831	$C_9H_{11}O_3$	167,0708	-0,7	diisopropylamin, benzen, ethyn
163,0779	209,1814	C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> NO (C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N, C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> , CH <sub>2</sub> O)	3,4	209,1780	$C_{10}H_{11}O_2$	163,0759	2,0	diisopropylamin, benzen, formaldehyd
139,0751	233,1842	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> NO (C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N, C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , CO)	6,2	233,1780	$C_8H_{11}O_2$	139,0759	-0,8	diisopropylamin, benzen, ethyn, oxid uhelnatý
137,0586	235,2007	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO (C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> N, H <sub>2</sub> O)	7,1	235,1936	$C_8H_9O_2$	137,0603	-1,7	<i>N,N</i> -diisopropyl-3-fenylprop-2-en-1-amin, voda
124,0542	248,2051	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> NO* (C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> N, CH <sub>3</sub> O*)	3,6	248,2015	$C_7H_8O_2$	124,0524	1,8	<i>N,N</i> -diisopropyl-3-fenylprop-2-en-1-amin, methoxylový radikál
117,0707	255,1886	C <sub>14</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub> (C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> , C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N)	5,1	255,1835	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub>	117,0704	0,3	diisopropylamin, 4-(hydroxymethyl)-4-methoxycyklohex-2,5-dienon
<b>114,1270</b>	<b>258,1323</b>	<b>C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>6,7</b>	<b>258,1256</b>	<b>C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>N</b>	<b>114,1283</b>	<b>-1,3</b>	<b>4-(hydroxymethyl)-4-methoxy-2-(1-fenylethyl)cyklohex-2,5-dienon</b>



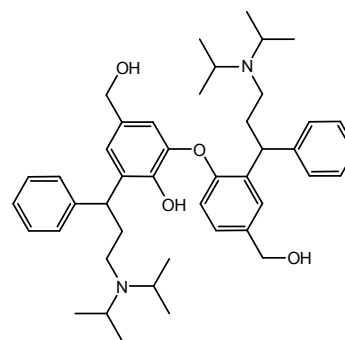
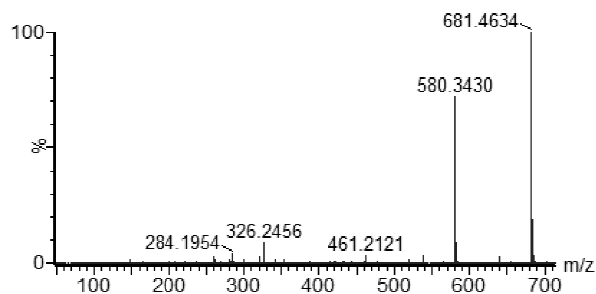
**Příloha 20** Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  produktu OP-H7 ( $C_{43}H_{57}N_2O_4$ ,  $m/z = 665,4357$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV s předešlou separací iontu a návrh jeho struktury

$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
665,4357	-	-	-	-	$C_{43}H_{57}N_2O_4$	665,4318	3,9	-
623,3765	42,0592	$C_3H_6$	12,3	42,0469	$C_{40}H_{51}N_2O_4$	623,3849	-8,4	propen
564,3112	101,1245	$C_6H_{15}N$	4,1	101,1204	$C_{37}H_{42}NO_4$	564,3114	-0,2	diisopropylamin
<b>538,2928</b>	<b>127,1429</b>	<b><math>C_8H_{17}N</math></b>	<b>6,8</b>	<b>127,1361</b>	<b><math>C_{35}H_{40}NO_4</math></b>	<b>538,2957</b>	<b>-2,9</b>	<b><i>N</i>-isopropyl-<i>N</i>-vinylpropan-2-amin</b>
522,2742	143,1615	$C_9H_{21}N$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_3H_6$ )	-5,9	143,1674	$C_{34}H_{36}NO_4$	522,2644	9,8	diisopropylamin, propen
496,2484	169,1873	$C_{11}H_{23}N$ ( $C_8H_{17}N$ , $C_3H_6$ )	4,3	169,1830	$C_{32}H_{34}NO_4$	496,2488	-0,4	<i>N</i> -isopropyl- <i>N</i> -vinylpropan-2-amin, propen
419,1674	246,2683	$C_{14}H_{34}N_2O$ ( $C_8H_{17}N$ , $C_6H_{15}N$ , $H_2O$ )	1,2	246,2671	$C_{29}H_{23}O_3$	419,1647	2,7	<i>N</i> -isopropyl- <i>N</i> -vinylpropan-2-amin, diisopropylamin, voda
359,1352	306,3005	$C_{20}H_{38}N_2$ ( $C_8H_{17}N$ , $C_6H_{15}N$ , $C_6H_6$ )	-3,0	306,3035	$C_{23}H_{19}O_4$	359,1283	6,9	<i>N</i> -isopropyl- <i>N</i> -vinylpropan-2-amin, diisopropylamin, benzen
264,1802	401,2555	$C_{27}H_{31}NO_2$ ( $C_{15}H_{23}N$ , $C_6H_6$ , $2CO$ , $C_4H_2$ )	20,1	401,2354	$C_{16}H_{26}NO_2$	264,1964	-16,2	<i>N,N</i> -diisopropyl-3-fenylprop-2-en-1-amin, benzen, 2x oxid uhelnatý, cyklobut-1-en-3-yn
216,1757	449,2600	$C_{28}H_{33}NO_4$	3,4	449,2566	$C_{15}H_{22}N$	216,1752	0,5	2-(3-(diisopropylamino)-1-fenylpropyl)-6-(2-hydroxy-5-(hydroxymethyl)fenyl)cyclohexa-2,5-dien-1,4-dion
114,1285	551,3072	$C_{43}H_{57}N_2O_4$	3,7	551,3035	$C_7H_{16}N$	114,1283	0,2	2-(3-(diisopropylamino)-1-fenylpropyl)-6-(2-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-3-(1-fenylpropyl)fenyl)cyclohexa-2,5-dien-1,4-dion



**Příloha 21** Tabulka fragmentů protonované molekuly  $[M+H]^+$  produktu OP-H8 ( $C_{44}H_{61}N_2O_4$ ,  $m/z = 681,4634$ ), jeho hmotnostní spektrum získané za použití rampy kolizní energie 15–35 eV bez předešlé separace iontu a návrh jeho struktury

$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Neutrální ztráta	Sumární vzorec ztráty	Chyba ztráty (mDa)	Teoretická hmotnost ztráty	Sumární vzorec iontu	Teoretická hmotnost iontu	Chyba iontu (mDa)	Název ztrát
681.4634	-	-	-	-	$C_{44}H_{61}N_2O_4$	681.4631	0,3	-
639.4076	42.0558	$C_3H_6$	8,9	42.0469	$C_{41}H_{55}N_2O_4$	639.4162	-8,6	propen
<b>580.3430</b>	<b>101.1204</b>	<b><math>C_6H_{15}N</math></b>	<b>0,0</b>	<b>101.1204</b>	<b><math>C_{38}H_{46}NO_4</math></b>	<b>580.3427</b>	<b>0,3</b>	<b>diisopropylamin</b>
538.2892	143.1742	$C_9H_{21}N$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_3H_6$ )	6,8	143.1674	$C_{35}H_{40}NO_4$	538.2957	-6,5	diisopropylamin, propen
520.2828	161.1806	$C_9H_{23}NO$ ( $C_6H_{15}N$ , $C_3H_6$ , $H_2O$ )	2,7	161.1779	$C_{35}H_{38}NO_3$	520.2852	-2,4	diisopropylamin, propen, voda
461.2121	220.2513	$C_{12}H_{32}N_2O$ ( $2C_6H_{15}N$ , $H_2O$ )	-0,1	220.2514	$C_{32}H_{29}O_3$	461.2117	0,4	2x diisopropylamin, voda
443.2154	238.2480	$C_{12}H_{34}N_2O_2$ ( $2C_6H_{15}N$ , $2H_2O$ )	-14,0	238.2620	$C_{32}H_{27}O_2$	443.2011	14,3	2x diisopropylamin, 2x voda
431.1903	250.2731	$C_{13}H_{34}N_2O_2$ ( $2C_6H_{15}N$ , $H_2O$ , $CH_2O$ )	11,1	250.2620	$C_{31}H_{27}O_2$	431.2011	-10,8	2x diisopropylamin, voda, formaldehyd
422.2439	259.2195	$C_{18}H_{29}N$ ( $C_{15}H_{23}N$ , $C_3H_6$ )	-10,5	259.2300	$C_{26}H_{32}NO_4$	422.2331	10,8	<i>N,N</i> -diisopropyl-3-fenylprop-2-en-1-amin, propen
415.1718	266.2916	$C_{14}H_{38}N_2O_2$ ( $2C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ , $2H_2O$ )	-1,7	266.2933	$C_{30}H_{23}O_2$	415.1698	2,0	2x diisopropylamin, ethen, 2x voda
387.1757	294.2877	$C_{15}H_{38}N_2O_3$ ( $2C_6H_{15}N$ , $C_2H_4$ , $2H_2O$ , $CO$ )	-0,5	294.2882	$C_{29}H_{23}O$	387.1749	0,8	2x diisopropylamin, ethen, 2x voda, oxid uhelnatý
353.1555	328.3079	$C_{19}H_{40}N_2O_2$ ( $2C_6H_{15}N$ , $H_2O$ , $CH_2O$ , $C_6H_6$ )	-1,0	328.3089	$C_{25}H_{21}O_2$	353.1542	1,3	2x diisopropylamin, voda, formaldehyd, benzen
326.2456	355.2178	$C_{22}H_{29}NO_3$	3,1	355.2147	$C_{22}H_{32}NO$	326.2484	-2,8	5-hydroxymethyltolterodin-2,3-dion
284.1954	397.2680	$C_{25}H_{35}NO_3$ ( $C_{22}H_{29}NO_3$ , $C_3H_6$ )	6,3	397.2617	$C_{19}H_{26}NO$	284.2014	-6,0	5-hydroxymethyltolterodin-2,3-dion, propen
147.0825	534.3809	$C_{34}H_{50}N_2O_3$ ( $C_{22}H_{29}NO_3$ , $C_6H_{15}N$ , $C_6H_6$ )	-1,2	534.3821	$C_{10}H_{11}O$	147.0810	1,5	5-hydroxymethyltolterodin-2,3-dion, diisopropylamin, benzen
121.0655	560.3979	$C_{36}H_{52}N_2O_3$ ( $C_{22}H_{29}NO_3$ , $C_6H_{15}N$ , $C_6H_6$ , $C_2H_2$ )	0,1	560.3978	$C_8H_9O$	121.0653	0,2	5-hydroxymethyltolterodin-2,3-dion, diisopropylamin, benzen, ethyn



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie**



# **AUTOREFERÁT**

**K DISERTAČNÍ PRÁCI**

**Studium a analytické využití elektrochemických  
transformací biologicky aktivních látek**

**Autor: Mgr. Pavla Macíková**

**Studijní obor: Analytická chemie, prezenční forma studia**

**Vedoucí disertační práce: prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.**

**Konzultant: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.**

**Olomouc 2013**



## Summary

An electrochemical behaviour of two antimuscarinic drugs, tolterodine (TOL) and fesoterodine (FES) and their active metabolite 5-hydroxymethyltolterodine (5-HMT) has been studied. The drugs are commercially available under the name Detrol/Detrusitol (TOL) and Toviaz (FES). They are indicated for the treatment of an overactive bladder with symptoms of urinary frequency, urgency or urge incontinence or any combination of these symptoms. Electrochemical behaviour of rutin was investigated on carbon paste electrodes (CPEs) using voltammetric and amperometric techniques. Rutin is naturally occurred flavonoid, which is useful in pharmacy for strengthening of blood capillaries.

Voltammetric study of three antimuscarinics (two drugs and their active metabolite) was performed using cyclic, linear sweep, differential pulse and square wave voltammetry. The oxidation of all three substances is pH dependent. TOL was oxidized in two irreversible steps. A third anodic signal of TOL was observed for  $\text{pH} \geq 6$ . FES provided one irreversible oxidation peak, but it was spontaneously hydrolyzed to 5-HMT in alkaline media. The oxidation of 5-HMT proceeded in two steps. Two corresponding reduction peaks appeared in cathodic scan of 5-HMT.

Chromatographic separation of TOL, FES and 5-HMT using HPLC with electrochemical detection was developed. Boron doped diamond electrode was chosen as an electrochemical sensor. Mobile phase consisted of acetonitrile and 0.05 mol/L aqueous phosphate buffer (pH 7) (30:70, v/v) provided a suitable separation and retention. Among four tested chromatographic columns, the best separation of the analytes was achieved with Nucleodur® CN-RP 3  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  2 mm I. D. Estimation of detection limits was in units of nmol/L. The method has a great potential for a determination of TOL, FES and 5-HMT in plasma or urine.

Three studied antimuscarinics were electrochemically oxidized using controlled potential electrolysis in different media at various values of applied potential. Oxidation products were subsequently analyzed using ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and mass spectrometry with electrospray ionization and quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry. Plenty of oxidation products were found in electrolyzed solutions of TOL, FES and 5-HMT including several dimers. Some metabolites produced by living organisms were among the products of electrooxidation of the antimuscarinic drugs.

Electrochemical behaviour of rutin was investigated on three carbon paste electrodes (CPEs): unmodified (CPE), iron (II) phthalocyanine modified CPE (IP/CPE) and CPE with ionic liquid 1-hexyl-3-methylimidazolium-bis(trifluoromethylsulfonyl)imide as a binder in carbon paste (IL/CPE). Iron (II) phthalocyanine as a CPE modifier revealed a mild electrocatalytic effect on the rutin oxidation. Strong adsorption of rutin observed on all electrode materials can be used for sensitivity improvement of voltammetric analysis by DPAdSV. Limit of detection 5 nmol/L was achieved with this technique on IL/CPE. Higher level of noise limits the usability of the studied electrodes to determine rutin by constant potential amperometry in stirred solution. To overcome this problem, a pulse amperometric method was applied and a detection limit in submicromolar concentration level of rutin using unmodified CPE was achieved. All three studied CPEs are applicable for determination of rutin in real samples as it was demonstrated on analysis of buckwheat seeds extract.

# Souhrn

V této disertační práci je sledováno elektrochemické chování dvou antimuskarinových léčiv, tolterodinu (TOL) a fesoterodinu (FES), a jejich společného aktivního metabolitu 5-hydroxymethyltolterodinu (5-HMT). Tato léčiva jsou komerčně dostupná pod názvem Detrol/Detrusitol (TOL) a Toviaz (FES) a používají se k léčbě urgentní inkontinence, naléhavé potřeby močení nebo zvýšené frekvence močení u pacientů s hyperaktivním močovým měchýřem. Také je studováno elektrochemické chování rutinu voltametričnými a amperometričnými technikami na uhlíkových pastových elektrodách (CPEs). Rutin je přírodně se vyskytující flavonoid, který našel uplatnění i ve farmacii například pro léčbu zvýšené lámavosti a propustnosti krevních vlásečnic.

Pro studium těchto antimuskarinů (dvou léčiv a jejich účinného metabolitu) byly nejdříve použity voltametričké techniky (cyklická, diferenční pulzní a square wave voltametrie). Oxidace všech tří látek je silně závislá na pH. TOL byl oxidován ve dvou ireverzibilních stupních, přičemž při  $\text{pH} \geq 6$  se objevoval třetí signál. Naproti tomu FES poskytoval pouze jeden ireverzibilní oxidační pík. V alkalickém prostředí docházelo k samovolné hydrolyze FES na 5-HMT. V záznamu cyklické voltametrie 5-HMT byly v anodické části patrné dva oxidační signály a v katodické oblasti jim odpovídající dva redukční píky.

Dále byla vyvinuta metoda chromatografické separace TOL, FES a 5-HMT pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí. Jako elektrochemické čidlo byla zvolena borem dopovaná diamantová elektroda. Z hlediska přiměřené retence a separace látek se jako mobilní fáze osvědčila směs acetonitril/fosfátový pufr o pH 7 a koncentraci 0,05 mol/l v poměru 30:70, v/v. Ze čtyř testovaných kolon bylo nejpříznivější separace dosaženo na koloně Nucleodur® CN-RP 3  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  2 mm I. D. Odhady mezi detekce se pohybovaly v jednotkách nmol/l. Tato metoda se může stát součástí postupu vhodného ke stanovení studovaných látek v moči nebo plazmě.

Za použití coulometrie za konstantního potenciálu byly TOL, FES a 5-HMT elektrochemicky oxidovány v různých prostředích a při různých potenciálech zvolených podle voltametričkových odezv látek v daném prostředí. Produkty elektrolyzy byly následně analyzovány metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC) a hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem a hybridním kvadrupólovým-průletovým analyzátozem. V elektrolyzovaných roztocích studovaných antimuskarinů byly nalezeny produkty vznikající dehydrogenací, hydroxylací, methoxylací nebo dimerizací. Mezi produkty elektrochemické oxidace studovaných antimuskarinů byly nalezeny i látky vznikající metabolickou cestou v živých organismech.

Bylo studováno elektrochemické chování rutinu na třech uhlíkových pastových elektrodách (CPEs): nemodifikované (CPE), modifikované ftalocyaninem železnatým (IP/CPE) a s iontovou kapalinou 1-hexyl-3-methylimidazolium-bis(trifluoromethyl-sulfonyl)imidem jako pojivem uhlíkové pasty (IL/CPE). Modifikátor ftalocyanin železnatý se projevil elektrokatalytickým účinkem na oxidaci rutinu. Iontová kapalina zvyšovala proudovou odezvu rutinu se současným zvýšením proudového pozadí, což bylo zřejmě způsobeno zvětšením elektroaktivní plochy elektrody. Rutin byl silně adsorbován na povrch všech studovaných pracovních elektrod, což mohlo být využito ke zvýšení citlivosti použitím metody DPAdSV. Na IL/CPE bylo dosaženo meze detekce 5 nmol/l. Pro potlačení šumu amperometričkových záznamů při použití studovaných CPEs byla vyvinuta pulzní amperometričká metoda, se kterou bylo navíc dosaženo nižších mezí detekce. Všechny testované CPEs jsou použitelné pro analýzu rutinu v reálných vzorcích, jak bylo prokázáno analýzou extraktů ze semen pohanky seté.

# Obsah

<b>SUMMARY</b>	<b>1</b>
<b>SOUHRN</b>	<b>2</b>
<b>OBSAH</b>	<b>3</b>
<b>ÚVOD</b>	<b>4</b>
<b>PŘEHLED AKTUÁLNÍHO STAVU PROBLEMATIKY</b>	<b>5</b>
<b>CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE</b>	<b>10</b>
<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>11</b>
<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b>	<b>13</b>
<b>ZÁVĚR</b>	<b>33</b>
<b>LITERATURA</b>	<b>34</b>
<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>38</b>

# Úvod

V každém žijícím organismu neustále probíhají chemické přeměny. Díky těmto přeměnám mohli lidé najít, či připravit léky proti nemocem, protilátky proti jedům vyskytujícím se v přírodě, zjistit důležitost antioxidantů, vitamínů nebo stopových prvků v organismu. Procesy zpracování látek *in vivo* se lidé pokouší simulovat různými metodami mimo tělo, *in vitro*.

Elektrochemie se do povědomí široké veřejnosti zapsala především díky českému fyzikálnímu chemikovi, objeviteli polarografie a zakladateli polarografické školy, nositeli Nobelovy ceny za chemii z roku 1959, Jaroslavu Heyrovskému. Jeho významný objev přispěl k velkému rozvoji elektrochemie a také její spojení s jinými technikami stále nachází své místo ve vědě. Elektrochemicky je možno napodobit některé procesy probíhající v organismu tak, že léčivo, či jiná látka je například coulometricky za konstantního potenciálu oxidována, nebo redukována. Produkty těchto elektrochemických přeměn je možno dále, nejlépe chromatograficky, separovat a následně detegovat hmotnostní spektrometrií.

Tato práce ukazuje několik možností využití elektrochemie jako nástroje simulace a popisu elektrochemických transformací biologicky aktivních látek a také jejich stanovení. Jsou popsány elektrochemické vlastnosti dvou antimuskarinových léčiv tolterodinu (TOL) a fesoterodinu (FES) a jejich společného aktivního metabolitu 5-hydroxymethyltolterodinu (5-HMT) pomocí voltametrických technik, jako například diferenční pulzní voltametrie, cyklické voltametrie nebo square wave voltametrie. Dále je studováno elektrochemické chování rutinu na uhlíkových pastových elektrodách voltametrickými a amperometrickými technikami. Také je ukázána možnost využití elektrochemie pro detekci TOL, FES a 5-HMT po jejich separaci kapalinovou chromatografií s borem dopovanou diamantovou elektrodou jako detekčním čidlem. Poslední aplikací elektrochemie je zde elektrochemická oxidace TOL, FES a 5-HMT za použití coulometrie za konstantního potenciálu s následnou analýzou produktů metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC) a hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem a hybridním kvadrupólovým-průletovým analyzátozem (Q-TOF).

# Přehled aktuálního stavu problematiky

## *Elektrochemická cela*

Elektrochemické techniky jsou již dlouhá léta používány ke zjišťování elektrochemických vlastností a chování elektrochemicky aktivních látek. Také spojení elektrochemie s jinými analytickými technikami je již dlouho známo. Například kapalinová chromatografie s elektrochemickou celou jako detektorem je velmi citlivou metodou detekce elektroaktivních látek po jejich separaci. Výběr elektrodového materiálu pro elektrochemický detektor má vliv na citlivost a selektivitu. Jako elektrochemické senzory již byly u HPLC nebo CE použity uhlíková disková elektroda [1], uhlíkové vlákno [2], mikrodisková elektroda ze svazku uhlíkových vláken [3], uhlíková pastová elektroda [4], grafitová disková elektroda [5], platinová elektroda [6], zlatá elektroda [7], měděná elektroda [8] a chemicky modifikované elektrody [9].

Novinkami v amperometrických detektorech jsou borem dopovaná diamantová elektroda (BDD) nebo uhlíkové mikrovlákno. Několik prvních aplikací BDD elektrody jako amperometrického detektoru pro HPLC bylo publikováno v roce 2002 pro detekci šesti tricyklických antidepresiv (imipraminu, desipraminu, clomipraminu, amitriptylinu, nortriptylinu a doxepinu) [10], homocysteinu [11] a chlorfenolů [12]. Později byl tento detektor využit v elektroforéze pro detekci nitroaromatických výbušnin, organofosfátových insekticidů a fenolů [13], aromatických aminů [14] a purinů [15]. Výhodou BDD elektrody je široké užité potenciálové okno ve vodném prostředí až do 3,5 V, nízký kapacitní odpor, vysoká chemická stabilita, nízké limity detekce až v jednotkách pmol a také to, že na jejím povrchu nedochází k vývoji kyslíku [11,16]. Ještě mladším elektrochemickým senzorem je uhlíkové mikrovlákno, které vykazuje vynikající citlivost, stabilní signál a velmi široký rozsah použití [17].

## *Spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií*

Pro spojení EC/MS bylo důležité najít vhodný iontový zdroj kompatibilní s elektrochemickou celou. V roce 1986 Hambitzer se svými kolegy poprvé použil jako iontový zdroj termosprej (TSP) k ionizaci netěkavých látek [18]. Pro EC/MS spojení byly poté použity v iontových zdrojích principy bombardování rychlými atomy (FAB) [19], chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) [20] a ionizace svazkem částic (PB) [21]. Dobře kompatibilním s EC se ukázal být iontový zdroj indukčně vázané plazma (ICP-MS) [22]. Však nejlépe vyhovující ionizační technikou se stal elektrosprej (ESI), který je od svého prvního použití v roce 1995 [23] nejrozšířenějším iontovým zdrojem pro EC/MS analýzy polárních, netěkavých a tepelně labilních látek. Toto spojení bylo úspěšně použito v mnoha různých oblastech výzkumu zahrnující metabolismus léčiv [24–27], analýzu proteinů [28], peptidů [29] a DNA [30], kvantifikaci biomolekul [31] nebo procesy předúpravy vzorku [32]. Z novějších technik byl pro EC/MS online spojení úspěšně použit desorpční elektrosprej [33]. Vzápětí si našel své místo v EC/MS spojení také iontový zdroj rozprašující roztok z povrchu nanoelektrosprejem [34].

Novější uplatnění elektrochemie (EC) je ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS), k nimž může být navíc zařazena kapalinová chromatografie (LC). Skupina U. Karsta z Univerzity v Münsteru se rozsáhle zabývá studiem metabolismu biologicky aktivních látek za pomoci online spojení EC/(LC)/MS, např. alkaloidů galantaminu a lycorinu [26], diclofenacu [35], verapamilu [36], tetrazepamu [37], toremifenu [38], fenothiazinu [39] a mnoho dalších. Jsou však i jiné instituce ve světě zabývající se touto problematikou. Na univerzitě v Nantes ve Francii použili EC/LC/MS pro studium oxidativní degradace acetobutololu [40]. Vědci z Osaky v Japonsku pomocí metody online

EC/ESI-MS studovali elektrochemickou oxidaci antipsychotika zotepinu [41]. Také na Univerzitě Palackého v Olomouci bylo publikováno EC/MS spojení pro ke studiu anthokyaninů [42].

### *Miniaturizace elektrochemické cely*

Němečtí a Nizozemští vědci vynalezli mikrofluidní mikroreaktor pro elektrochemické přeměny analytů. Tento čip byl zkonstruován z platinové pracovní a pomocné elektrody a paladiové referentní elektrody. Cyklické voltamogramy naměřili v objemu pouhých 9,6 nl. Tento mikročip použili ke studiu metabolické cesty amodiaquinu ve spojení EC/LC/MS Stejná měření provedli také na komerčně dostupné elektrochemické cele a získali srovnatelné výsledky jako na mikročipu [43]. O rok později ti samí vědci použili tento mikročip s pseudo-referentní elektrodou s oxidem iridičitým, která má také sloužit pro simulaci oxidativního metabolismu léčiv [44].

### *Elektrody na bázi uhlíkové pasty*

Uhlíková pastová elektroda (CPE) původně vznikla jako alternativa ke rtuťové kapkové elektrodě. Nabídla možnost anodické oxidace pomocí elektrody s obnovitelným povrchem. Největší výhodou CPE je možnost její modifikace a tím zvýšení její selektivity a citlivosti. Modifikátor může sloužit také jako katalyzátor elektrochemické reakce analytu [45,46]. Modifikátory CPE je možné rozdělit do několika skupin: měničů iontů a adsorbenty (zeolity a pryskyřicové katexy pro akumulaci těžkých kovů), organické modifikátory (1,10-fenantrolin a jeho deriváty, oximy a dimethylglyoximy vhodné pro analýzu nikelnatých nebo kobaltnatých iontů), kovové komplexy (ftalocyanin kobaltnatý, zinečnatý, železnatý nebo měďnatý, porfíny, berlínská modř), modifikátory využívané v biosenzorech (oktaldehyd s  $\text{NAD}^+$ , křenová peroxidasa, glukosooxidasa, řasy) [46]. Do uhlíkové pasty již byly přimíchány a využity k měření mechy, lišejníky, tabák, z ovoce např. ananas, banán, jablko, dále také houby, bakterie, viry a mnoho dalších [47].

Často používanými modifikátory uhlíkových pastových elektrod bývají ftalocyaninové komplexy kovů (MPc), které mohou mít elektrokatalytický efekt na redoxní reakce různých látek. Například ftalocyaninové komplexy železa (FePc) mohou katalyzovat elektroredukce kyslíku [48], organických peroxidů [49], oxidu siřičitého [50], dusitanů [51] nebo fotoredukce oxidu uhličitého [52]. MPc mohou katalyzovat také elektrooxidace mnoha molekul [53]. Například byla pozorována elektrokatalytická aktivita FePc (ftalocyaninu železnatého (IP), tetrasulfoftalocyaninu železnatého a tetraaminoftalocyaninu železnatého) jako modifikátorů CPE na oxidaci dopaminu a serotoninu. Centrem elektrokatalytické aktivity MPc je právě ion kovu v komplexu. Mechanismus katalytické oxidace látky za použití MPc je založen na oxidaci MPc následované přenosem elektronu z látky na oxidovaný MPc. MPc obsahující elektroaktivní kov jako železo nebo kobalt mají zpravidla lepší katalytickou aktivitu než například nikl a měď. U FePc elektrochemicky generovaný vyšší oxidační stav železa v komplexu (z  $\text{Fe}^{\text{II}}$  na  $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) podporuje oxidaci látek [54]. Ftalocyaninem železnatým modifikovaná CPE (IP/CPE) byla použita k voltametrickému stanovení adrenalinu, kyseliny askorbové a kyseliny močové [55]. Další studie prokázaly elektrokatalytickou aktivitu IP/CPE na redoxní reakci kyseliny askorbové [56], epinefrinu [57] nebo elektrooxidaci amitrolu [58]. FePc vynikají elektrokatalytickou aktivitou pro širokou škálu látek, proto byl v této disertační práci použit IP jako modifikátor CPE pro stanovení rutinu.

Jako modifikátor CPE lze využít také iontovou kapalinu (IL). Tyto látky vynikají výbornou elektrickou vodivostí, ve vodě jsou téměř nerozpustné, vůči jiným chemikáliím jsou inertní a odolávají vysokým teplotám s takřka zanedbatelným tlakem par. Mohou přispívat ke zlepšení voltametrického signálu, zvýšení citlivosti měření a mohou sloužit jako katalyzátory některých elektrochemických reakcí. Základní strukturu mnoha ILs tvoří heterocyklický kation a anion [59]. Příkladem aplikace uhlíkové pastové elektrody modifikované iontovou kapalinou *N*-butyl-pyridinium hexafluorofosfátem

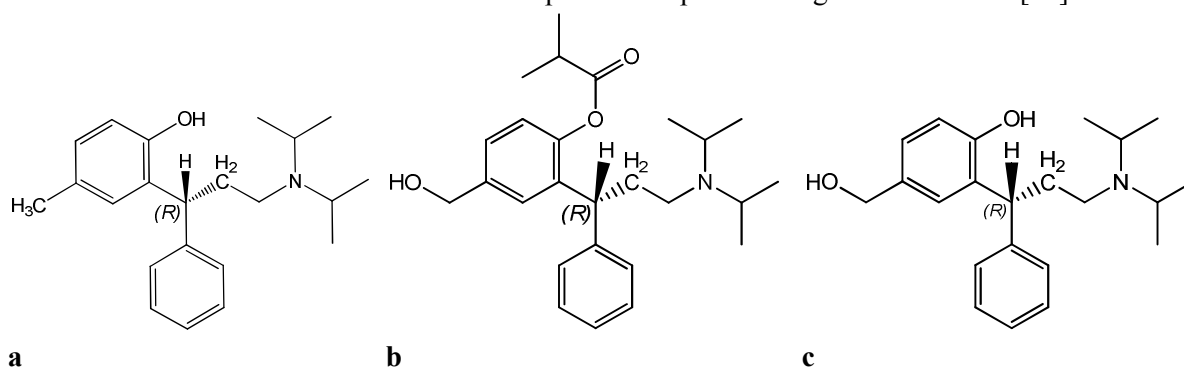
je elektrokatalytická oxidace dopaminu. Ve srovnání s nemodifikovanou CPE byly odezvy i proudové pozadí elektrody s IL (IL/CPE) mnohem vyšší [60]. Jiná IL/CPE s 1-butyl-3-methylimidazolium-bis(trifluoromethylsulfonyl) imidem jako pojivem projevila vysokou účinnost na elektrokatalytickou oxidaci formaldehydu v alkalickém prostředí [61]. Byl vyvinut biosenzor adrenalinu, CPE obsahující enzym laktasu z houby *Aspergillus oryzae* v celém objemu uhlíkové pasty. Jako pojivo sloužila směs Nujolu a IL (BMI PF<sub>6</sub> nebo BMI Tf<sub>2</sub>N). Vyšší odezvu adrenalinu poskytovala elektroda s BMI Tf<sub>2</sub>N ve srovnání s elektrodou obsahující BMI PF<sub>6</sub>. Bylo dosaženo meze detekce 0,53 μmol/l [62]. V této disertační práci byla připravena CPE, v níž byla jako pojivo použita iontová kapalina 1-hexyl-3-methylimidazolium-bis(trifluoromethylsulfonyl)imid. Jde o dosud první aplikaci této IL jako modifikátoru CPE [63].

## Charakteristika a vlastnosti studovaných látek

### Antimuskarinika

Antimuskarinová léčiva tolterodin (TOL, Obr. 1 a) a fesoterodin (FES, Obr. 1 b) jsou komerčně dostupná pod názvem Detrol/Detrusitol (TOL) a Toviaz (FES) a používají se k léčbě urgentní inkontinence, naléhavé potřeby močení nebo zvýšené frekvence močení u pacientů s hyperaktivním močovým měchýřem. V těle jsou metabolizována různými cestami na hlavní aktivní metabolit 5-hydroxymethyltolterodin (5-HMT, Obr. 1 c). Primární metabolická cesta TOL je vedena přes oxidaci methylové skupiny prostřednictvím isoenzymu cytochromu P450 2D6 za vzniku 5-HMT. Fesoterodin je na 5-HMT v těle přeměněn hydrolyzou za účasti nespecifických esteráz [64,65].

Nejčastěji používanou analytickou technikou pro stanovení tolterodinu a jeho metabolitů včetně 5-HMT je vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí. Příkladem jsou tři studie stanovení TOL a 5-HMT v lidské plazmě s různými podmínkami. Švédští vědci v roce 2005 prováděli toto stanovení na koloně C<sub>18</sub> (5 μm, 150 × 2 mm) při 40 °C s mobilní fází CH<sub>3</sub>CN/0,01M–CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (1:1, v/v), s ionizací elektrospřejem (ESI) a kvadrupólovým analyzátozem [66]. Kolonu Hypersil silica (3 μm, 30 × 4 mm) s mobilní fází 0,02M–CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>CN (30:70, v/v), ionizací ESI a trojitý kvadrupól (QqQ) použil Macek a kol. v roce 2009 [67]. Indičtí vědci o rok později použili také techniku HPLC/ESI-QqQ-MS/MS, kolonu C<sub>18</sub> (5 μm, 100 × 4,6 mm) při 40 °C s mobilní fází 0,01M–HCOONH<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>CN (35:65, v/v). Novější publikace dosáhla oproti předešlým studiím snížení množství spotřebované plasmy na analýzu (300 μl), nejkratší doby analýzy a navíc metodu použili ke studii bioekvivalence na 41 zdravém člověku po orálním podání 2 mg léčiva v tabletě [68].



Obr. 1. Strukturální vzorec tolterodinu (a), fesoterodinu (b) a 5-hydroxymethyltolterodinu (c)

HPLC s UV detekcí byla kvůli nižší citlivosti využívána pro stanovení TOL a 5-HMT v tabletách léčiva. Tyto látky nejlépe absorbují při vlnové délce 210 nebo 220 nm [69]. Pomocí HPLC/UV na chirálních stacionárních fázích je možno oddělení enantiomerů TOL, což dovoluje stanovit (S)-TOL jako nečistotu v léčivu obsahujícím (R)-TOL [70,71]. Z dalších analytických technik byla pro stanovení TOL a 5-HMT použita plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS)

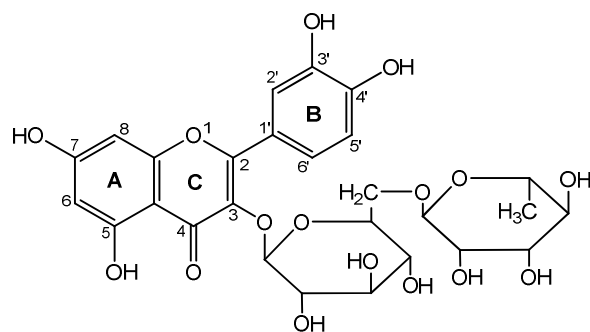
s nutností derivatizace [72], kapilární elektroforéza (CE) [73] a rovněž byly pro tyto látky navrženy spektrofotometrické metody [74].

Pro stanovení FES v tabletách léčiva byla doposud použita HPLC/ESI-MS/MS na reverzních fázích Luna C<sub>8</sub> (3 μm, 50 × 3 mm) s mobilní fází methanol/0,1 % kyselina mravenčí (90:10, v/v) [75]. Rychlá a levná UV spektrofotometrická metoda (228 nm) byla vyvinuta pro stanovení FES v léčivých tabletách a byla srovnána s třemi validovanými metodami LC, CE a LC/MS/MS s podobnými výsledky [76]. Degradací produkty fesoterodinu za různých podmínek (kyselé, bazické, oxidativní, teplotní a fotolytické) byly studovány a charakterizovány LC/UV/ESI-MS na monolitické koloně. Fesoterodin se rozkládal na látky o *m/z* 342,5 (5-HMT); 356,6; 175,2; 284,5; 365,7 a 393,4. V kyselém prostředí 1M-HCl byla zjištěna degradace 10 % FES, ve 2M-HCl 32 % FES [77]. Pro stanovení FES a 5-HMT v lidské plazmě byla navržena metoda LC/ESI-MS/MS pro rozsah koncentrací analytů 0,01 – 10 ng/ml, na koloně Kromasil C<sub>18</sub> (5 μm, 100 × 4,6 mm) termostátované na 30 °C s mobilní fází 0,015M-HCOONH<sub>4</sub> (upraven kyselinou mravenčí na pH 5,5)/CH<sub>3</sub>CN (25:75, v/v) [78].

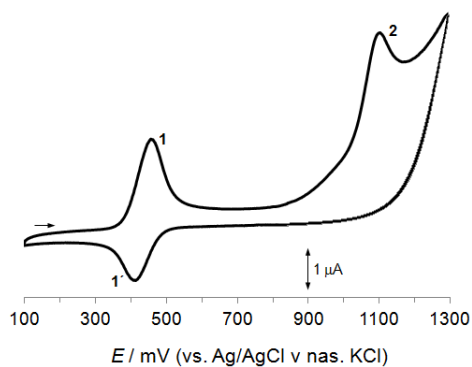
Elektrochemické chování TOL je součástí této disertační práce podpořené publikací [79]. Elektrochemické chování FES a 5-HMT dosud nebylo popsáno a je součástí této disertační práce.

## Rutin

Rutin je řazen mezi nejbioaktivnější flavonoidy z podskupiny flavonolů. Je popsáno široké spektrum příznivých účinků rutinu v lidském organismu, které jsou podpořeny jeho silnou antioxidační aktivitou. Bylo zaznamenáno jeho protizánětlivé [80], antibakteriální [81], nebo gastroprotektivní působení [82], dále neuroprotektivní efekt u Parkinsonovy choroby [83], ochranný účinek proti poškození DNA [84], dále snižuje hladinu cholesterolu v krvi [85], ochraňuje kardiovaskulární systém [86] a obecně příznivě působí při léčbě chorob s produkcí volných kyslíkových radikálů např. revmatoidní artritida [87].



Obr. 2. Struktura rutinu



Obr. 3. Cyklický voltamogram 0,1 mmol/l rutinu v Britton-Robinsonově pufru o pH 4,5, rychlost scanu 100 mV/s.

Struktura rutinu (Obr. 2) je tvořena necukernou složkou, aglykonem, kterou představuje kvercetin a na ten je přes kyslík v kruhu C v poloze 3 navázán disacharid rutinosa zastupující cukernou část rutinu. Proto je též rutin nazýván jako kvercetin-3-*O*-rutinosid. Jedná se o krystalickou látku se žlutým zabarvením, které může působením světla postupně hnědnout. Krystaly rutinu běžně obsahují molekuly vody. Dehydratovanou formu by bylo možné získat po dvanácti hodinách sušení při 110 °C. Rutin je dobře rozpustný v pyridinu, formamidu, méně v alkoholech, vodě, acetonu, ethylacetátu a téměř nerozpustný v chloroformu, etheru a benzenu. Elementární složení rutinu je C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub> s molární hmotností 610,52 g/mol a přesnou hmotností 610,1534 Da [88].

Rutin je v těle primárně metabolizován střevními bakteriemi za odtržení glykosylů na kvercetin-3-*O*-glukosid a následně na kvercetin, rovněž velmi silný antioxidant, který svými účinky doplňuje



rutin v jeho bioaktivitě. Dalšími metabolity rutinu jsou 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina, 4-hydroxyfenyloctová kyselina, floroglucinol a 3,4-dihydroxybenzaldehyd [89].

Rutin je ve značném množství přítomen v rostlinách, ovoci a zelenině. Velmi bohatým zdrojem rutinu je pohanka. Množství rutinu v této rostlině závisí na mnoha faktorech. Existuje několik druhů pohanky, které se liší množstvím obsaženého rutinu. Největší množství rutinu bylo nalezeno v pohance tatarské (*Fagopyrum tataricum*), méně v pohance seté (*Fagopyrum esculentum*) a nejméně v pohance divoké (*Fagopyrum homotropicum*) [90]. Množství obsaženého rutinu také závisí na místě růstu pohanky. V oblasti s intenzivnějším dopadem slunečního záření bude rostlina obsahovat více rutinu. Zároveň osvětlenější část rostliny, např. květenství a stonek, bude bohatší na rutin, než např. kořen, protože rostlina se produkcí flavonoidů, které pohlcují dopadající UV záření, chrání před sluncem [91]. Rutin je dále přítomen v nepřeberném množství plodin, jako jsou citrusy, švestky, jablka, borůvky, maliny, česnek, petržel, fenykl, třezalka, zelený, černý, mátový čaj, ječmen, chmel a tedy i pivo. Přítomnost rutinu byla zjištěna v řadě českých i zahraničních piv přičemž průměrný obsah se pohyboval kolem 0,5 mg na 1 l piva [92].

Rutin je nejčastěji stanovován kapalinovou chromatografií s UV-Vis [93], hmotnostní [94], elektrochemickou [95], nebo chemiluminiscenční detekcí [96]. Byl stanovován také hmotnostní spektrometrií MALDI-MS [97], MALDI-TOF-MS [98], ESI-MS/MS [99]. Dále byla pro stanovení rutinu použita rovněž plynová chromatografie s hmotnostní detekcí avšak s nutností derivatizace směsí BSTFA/pyridin/ethylacetát (20:5:25, v/v/v) [100]. I kapilární elektroforéza byla hojně užívanou metodou pro stanovení rutinu [101]. Ze spektrálních metod byly pro analýzu rutinu použity UV spektrofotometrie [102], NMR [103], povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS) a infračervená spektroskopie [104].

Rutin je stejně jako ostatní flavonoidy elektroaktivní. Jeho elektrochemické chování dobře popisuje cyklický voltamogram (Obr. 3). První anodická vlna s maximem při potenciálu 460 mV odpovídá dvouelektronové oxidaci hydroxylových skupin s účastí dvou protonů v kruhu B v polohách 3' a 4', jejímž produktem je *o*-chinon. Těto reverzibilní reakci odpovídá redukční signál s maximem při potenciálu 430 mV. Druhý oxidační pík při 1080 mV odpovídá ireverzibilní reakci, již se účastní hydroxylové skupiny v kruhu A v polohách 5 a 7 [105,106]. Jiná studie popisuje druhý oxidační signál rutinu jako přeměnu –OH skupiny v poloze 7 a vznik kyslíkového volného radikálu směřující k tvorbě molekuly O<sub>2</sub>, který může být dále oxidován při ještě pozitivnějším potenciálu, což může vést k otevření cyklu C [107]. Nejnovější studie mechanismu oxidace kvercetinu, tvořícího necukernou složku rutinu, popisuje třístupňovou oxidaci ve vodném roztoku o pH 5,3 [108].

Kromě cyklické voltametrie byly pro studium rutinu využity i jiné elektroanalytické techniky, například diferenční pulzní voltametrie (DPV), square-wave voltametrie (SWV), linear sweep voltametrie (LSV) [109], chronocoulometrie [110], chronopotenciometrie [111] a voltabsorptometrie [107], metoda kombinující CV a spektrofotometrii.

Jedním z cílů této práce je studium chování rutinu na modifikovaných uhlíkových pastových elektrodách. V literatuře je k nalezení řada publikací zabývajících se voltametriickým stanovením tohoto flavonoidu na uhlíkových pastových elektrodách. Všechny však využívají pro stanovení rutinu voltametriické techniky [112-120]. V této disertační práci je popsáno stanovení rutinu na uhlíkových pastových elektrodách také pomocí amperometriických technik [63].

## Cíle disertační práce

Cílem disertační práce bylo studium elektrochemických tranformací biologicky aktivních látek. Konkrétně byly naplánovány tyto úkoly:

- prostudovat elektrochemické vlastnosti, chování a mechanismus oxidace antimuskarinových léčiv, tolterodinu a fesoterodinu, a jejich společného aktivního metabolitu 5-hydroxymethyltolterodinu voltametrickými technikami
- separovat tyto látky pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí na borem dopované diamantové elektrodě s ohledem na pozdější aplikace metody pro stanovení těchto léčiv v moči a plazmě
- připravit produkty oxidace těchto látek elektrolyzou za konstantního potenciálu a následně je analyzovat pomocí UPLC/ESI-MS
- vyhodnotit hmotnostní spektra produktů a navrhnout jejich strukturu
- z výsledků voltametrických měření a UPLC/ESI-MS analýz navrhnout mechanismus elektrochemické oxidace tolterodinu, fesoterodinu a 5-hydroxymethyltolterodinu
- sledovat vliv modifikace uhlíkové pasty na elektrochemické chování rutinu
- vyvinout čidlo pro amperometrickou detekci rutinu

Kromě předložené disertační práce jsou výsledky obsahem dvou publikací v impaktovaných časopisech [63,79].

# Experimentální část

## *Syntéza 5-hydroxymethyltolterodinu*

Fesoterodin fumarát (102 mg, 0,19 mmol) byl rozpuštěn v ethanolu (10 ml). Bylo přidáno 10 ml amoniaku (25 %) a reakční směs byla 48 hodin míchána za laboratorní teploty. Bílá sraženina byla odfiltrována, promyta vodou a vysušena vzduchem. Celkem bylo získáno 55 mg produktu (výťažek 83 %). Identita produktu byla zjištěna hmotnostní spektrometrií.

## *Příprava uhlíkových pastových elektrod*

Uhlíková pasta byla připravena smícháním 200 mg grafitových vloček s 80  $\mu$ l parafinového oleje. CPE s ftalocyaninem železnatým (IP/CPE) byla připravena náhradou 10 % hmotnosti grafitových vloček ftalocyaninem železnatým. CPE s iontovou kapalinou (IL/CPE) byla připravena z 200 mg grafitových vloček a 100  $\mu$ l iontové kapaliny [hmin][Tf<sub>2</sub>N]. Směs byla homogenizována do vzniku soudržné pasty. Pastou bylo naplněno teflonové elektrodové pouzdro se závitem.

## *Voltametrické experimenty*

Před každým měřením byla GCE leštěna na navlhčené jemné textilii za použití 0,05 mm aluminy (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) a vložena na 10 s do ultrazvukové lázně. Elektrodový povrch CPE byl obnovován před každým scanem odstraněním malého množství pasty vytlačené pístem z elektrodového rezervoáru. Elektrodový povrch CPEs byl leštěn na hladkém papíře. Cyklické voltamogramy byly zaznamenávány při rychlosti scanu 50 nebo 100 mV/s. Při měření závislosti na rychlostech scanu byla rychlost scanu variována v různých rozsazích, konkrétní hodnoty jsou uvedeny u jednotlivých experimentů. DPV experimenty byly prováděny při modulační amplitudě 0,05 V, době trvání pulzu 100 ms a rychlosti scanu 20 mV/s. Square wave voltamogramy byly zaznamenávány při rychlosti scanu 125 mV/s, amplitudě 0,02 V, době trvání pulzu 40 ms a frekvenci 25 Hz. Všechny experimenty byly prováděny v nízkoobjemové nádobce s maximálním objemem 2 ml. V případě potřeby byly elektrolyty před měřením probublány dusíkem.

Mez detekce a stanovitelnosti pro TOL a FES a pro amperometrické experimenty s rutinem byly vypočítány podle přímé metody signálu (IUPAC), která využívá intervalů spolehlivosti odhadů  $Y$  (odezvy měřicího přístroje) [121], ve statistickém programu QC Expert (TriloByte Statistical Software, Pardubice, ČR). Jako regresní model je použita přímka, hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ . Směrnice lineárních závislostí („Slope“) a jejich směrodatné odchylky („Standard Error“) byly počítány v programu OriginPro 8 SR0 (OriginLab Corporation, Northhampton, MA, USA). Odhad meze detekce a stanovitelnosti rutinu pro DPV a DPAdSV byly určeny experimentálně jako trojnásobek (LOD) nebo desetinásobek (LOQ) šumu základního elektrolytu, další parametry těchto kalibračních závislostí byly počítány v programu OriginPro 8 SR0. Přesnost a správnost měření rutinu bylo vyhodnocováno z modelových vzorků rutinu přidáním 2 ml, 0,4 ml a 0,06 ml standardního roztoku rutinu o koncentraci 1 mmol/l do octanového pufru (pH = 4) v destilované vodě o celkovém objemu 1000 ml. Objem 10 ml byl převeden do voltametrické cely a analyzován s použitím metody standardního přídatku. Byly použity tři přídatky standardního roztoku rutinu. Počet opakování měření každého modelového vzorku  $n = 5$ .

## *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí*

Mobilní fáze byla připravena rozpuštěním naváženého množství dihydrogenfosforečnanu sodného (pro pH 3 a 5) nebo hydrogenfosforečnanu sodného (pro pH 7) ve vodě. Pro odstranění

nerozpuštěných částic byly pufrы zfiltróvány přes 0,2  $\mu\text{m}$  porézní filtr a smíchány s acetonitrilem v požadovaném objemovém poměru. pH mobilní fáze bylo nastaveno na požadovanou hodnotu koncentrovanou kyselinou fosforečnou. Průtoková rychlost byla nastavena na 0,3 ml/min. Potenciál cely byl variován podle potřeby, konkrétní hodnoty jsou uvedeny u jednotlivých experimentů (vs. Pd/H<sub>2</sub>). Potenciál ochranné cely byl nastaven na 750 mV. Citlivost měření byla regulována podle potřeby od 0,5  $\mu\text{A}$  do 20  $\mu\text{A}$ . Referenční UV detekce byla zaznamenávána při vlnové délce 210 nm. Nástřik vzorku byl prováděn přeplněním 4  $\mu\text{l}$  nástřikové smyčky. Hydrodynamické voltamogramy modelové směsi standardů látek TOL, FES, 5-HMT a vnitřního standardu berberinu o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  byly měřeny postupným zvyšováním potenciálu po 70 mV v rozsahu potenciálů od 700 mV do 1470 mV. Následně byly hydrodynamické voltamogramy vyhodnoceny jako závislosti ploch pík standardů ( $\mu\text{A} \cdot \text{s}$ ) na aplikovaném potenciálu. Odhad mezí detekce a stanovitelnosti TOL, FES a 5-HMT byly určeny experimentálně jako trojnásobek (LOD) nebo desetinásobek (LOQ) šumu slepého pokusu.

### *Elektrolýza za konstantního potenciálu s analýzou oxidačních produktů metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií*

Elektrolýza byla prováděna u TOL, FES a 5-HMT v různých prostředích při různých hodnotách konstantního potenciálu (Tabulka 2, Odd. 3). Všechny vzorky byly elektrolyzovány v míchaném roztoku o koncentraci 1 mmol/l (TOL) a 0,5 mmol/l (FES a 5-HMT) v celkovém objemu 1,2 nebo 1,6 ml, dokud proudová odezva neklesla na zbytkovou hodnotu.

Mobilní fázi A tvořil vodný roztok octanu amonného o koncentraci 0,01 mol/l a fázi B acetonitril. Separace probíhala s gradientem: 0–5 min (10–80 % B), 5–6 min (80 % B), 6–7 min (80–10 % B) a 7–10 min (10 % B). Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min, termostat kolony byl nastaven na 25 °C, teplota autosampleru na 10 °C. Objem nástřikovaného vzorku byl 3  $\mu\text{l}$  (TOL) nebo přeplněním nástřikové 20  $\mu\text{l}$  smyčky (FES a 5-HMT). Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem byla použita za následujících podmínek: napětí sprejovací kapiláry 3 kV (pozitivní mód), teplota zdroje 100 °C, vzorkovací kónus 30 V, desolvatační teplota 150 °C, průtoková rychlost plynu v kónusu 38 l/h a průtoková rychlost desolvatačního plynu 450 l/h. Použitým plynem ve zdroji byl dusík, kolizním plynem argon. Data byla získána průběžným snímáním při nižší kolizní energii 5 eV a při vyšší kolizní energii za použití rampy kolizní energie v rozsahu 15–35 eV nebo 5–15 eV.

### *Stanovení rutinu v extraktech z pohanky*

Pro stanovení rutinu v pohance seté byly vyzkoušeny čtyři extrakční postupy: povaření pohanky ve vodě (BWE), klasická Soxhletova extrakce (SE), vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (PSE) a nadkritická fluidní extrakce (SFE). Pro extrakce byly s analytickou přesností naváženy 1 nebo 2 g rozdrčených pohankových semen. Pro extrakci rutinu varem byla rozdrčená pohanková semena vařena po dobu pěti minut v přibližně 50 ml destilované vody. Po vychladnutí byly vzorky centrifugovány po dobu dvaceti minut a následně zfiltróvány. Pro SE byl jako rozpouštědlo použit methanol. Při zahřívání topným hnízdem probíhala extrakce po dobu dvou hodin. Extrakt byl doplněn v odměrné baňce methanolem. PSE extrakce probíhala za těchto podmínek: tlak 150 barů, teplota 100 °C, rozpouštědlo aceton. Byly provedeny dva cykly po deseti minutách statické extrakce. SFE extrakce oxidem uhličitým probíhala za podmínek: teplota extrakční cely  $t_e = 35$  °C, teplota restriktoru  $t_c = 100$  °C, teplota záchyty  $t_t = 30$  °C, tlak 25 MPa, doba analýzy 30 min, rozpouštědlo aceton. Extrakty byly analyzovány voltametricky. Srovnávací HPLC/UV-Vis metoda stanovení rutinu v modelových vzorcích a extraktech pohanky byla převzata z literatury [122].

# Výsledky a diskuze

## 1. Elektrochemické chování antimuskarinik

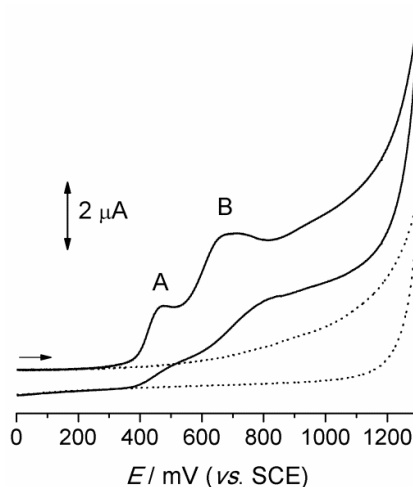
V této kapitole je sledováno elektrochemické chování látek tolterodinu, fesoterodinu a 5-hydroxymethyltolterodinu voltametričnými technikami (CV, DPV a SWV). Z cyklických voltamogramů, závislosti proudových odezví a potenciálů na pH, rychlosti scanu a koncentraci je získána představa o mechanismu oxidace těchto antimuskarinik.

### 1.1. Elektrochemické chování tolterodinu

Cyklický voltamogram tolterodinu v prostředí methanolu a B-R pufru pH 7,4 (1:1, v/v, Obr. 4) ukazuje dva oxidační signály s potenciály 480 mV (pík A) a 680 mV (pík B). V reverzním katodickém směru polarizace nebyl u TOL pozorován odpovídající redukční pik, což indikuje ireverzibilní děj.

Vliv rychlosti scanu na anodickou odezvu TOL byl sledován v prostředí B-R pufru pH 7,4 bez methanolu (i), s 50 % methanolu (ii) a v nevodném prostředí methanolu s octanem amonným (iii). Vyšší hodnoty směrnice v přítomnosti vodné složky indikují vliv adsorpce TOL na elektrodový povrch. Směrnice nižší než 0,5 v methanolicím prostředí může být důsledkem určitých kinetických procesů (např. dimerizace) doprovázejících elektrodovou reakci.

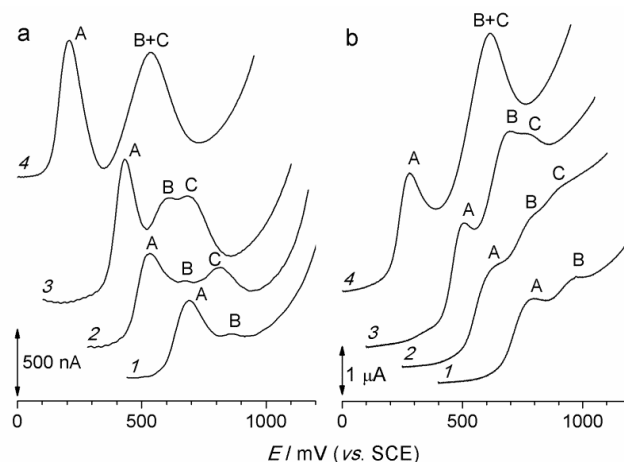
Obr. 4. Cyklický voltamogram TOL o koncentraci 0,1 mmol/l (—) a základního elektrolytu CH<sub>3</sub>OH/B-R pufr pH 7,4 (····), rychlost scanu 100 mV/s. →



U obou CV píků tolterodinu je pozorován posun potenciálu k pozitivnějším hodnotám se zvyšující se hodnotou rychlosti scanu. Hodnota směrnice  $E_p$ -log  $v$  v závislosti pro pík A odpovídá teoretickým předpokladům posunu potenciálu pro dvouelektronovou reverzibilní elektrodovou reakci následovanou ireverzibilní chemickou reakcí. Hodnota směrnice  $E_p$ -log  $v$  v závislosti pro pík B je typická pro jednoelektronovou elektrodovou reakci, kdy redukovaná i oxidovaná forma jsou silně adsorbovány na povrch elektrody [123,124].

Oxidace tolterodinu je závislá rovněž na pH. V kyselém prostředí do pH 5,5 dominuje pík A, pro pík B je pozorována jen velmi malá odezva (Obr. 5, křivka 1). Pro pH  $\geq 6$  se při pozitivnějším potenciálu objevuje třetí signál C (Obr. 5, křivka 2). Intenzita píků B a C se zvyšuje s rostoucím pH (Obr. 5, křivka 3) a při pH  $\geq 9$  se tyto signály překrývají za vzniku jednoho výrazného píku označeného B+C (Obr. 5, křivka 4).

Obr. 5. Diferenční pulzní (a) a lineární (b) voltamogramy tolterodinu (0,1 mmol/l) v CH<sub>3</sub>OH/B-R pufr (1:1, v/v), pH 4,1 (1), pH 6,5 (2), pH 8,2 (3), pH 11,3 (4). Rychlost scanu 20 mV/s (DPV), 100 mV/s (LSV). →



Ze závislosti potenciálu na pH je zřejmý posun potenciálu všech tří píků (A, B a C) k méně pozitivním hodnotám při zvyšování pH. Směrnice regresních přímků  $E_p$ -pH závislostí a jejich směrodatné odchylky napovídají, že první oxidační stupeň a další dva oxidační procesy do mírně

alkalického prostředí zahrnují stejný počet protonů a elektronů. Zlomový bod závislosti  $\text{pH} = 8,5$  by mohl odpovídat disociační konstantě některého oxidačního produktu tolterodinu ( $\text{p}K_a = 8,5$ ).

Kalibrační závislost anodických odezev tolterodinu (píku A a B) byly měřeny cyklickou voltametrií v rozsahu koncentrací 10–100  $\mu\text{mol/l}$  v prostředí  $\text{CH}_3\text{OH/B-R}$  pufru  $\text{pH} 7,4$ . Závislosti proudových odezev TOL na jeho koncentraci byly v měřeném rozsahu lineární. Byly zjištěny meze detekce 9,6  $\mu\text{mol/l}$  (pík A) a 40,0  $\mu\text{mol/l}$  (pík B), meze stanovitelnosti 13,9  $\mu\text{mol/l}$  (pík A) a 53,7  $\mu\text{mol/l}$  (pík B). Směrnice kalibračních přímk se směrodatnými odchylkami se rovnaly  $(0,194 \pm 0,005) \text{ nA l } \mu\text{mol}^{-1}$  (pík A) a  $(0,061 \pm 0,007) \text{ nA l } \mu\text{mol}^{-1}$ , úsek kalibračních přímk a jeho směrodatná odchylka byly  $(1,03 \pm 0,27) \text{ nA}$  (pík A) a  $(2,03 \pm 0,41) \text{ nA}$  (pík B) a koeficienty determinace 0,9978 (pík A) a 0,9524 (pík B).

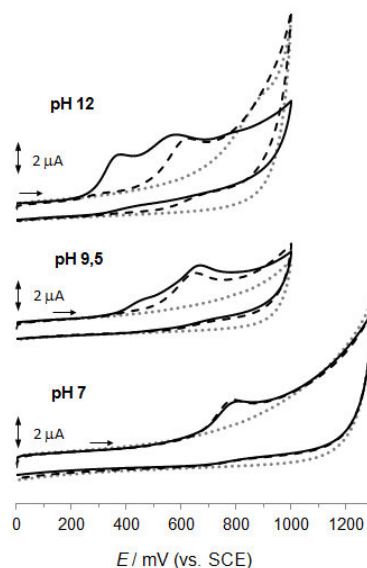
### 1.2. Elektrochemické chování fesoterodinu

Cyklický voltamogram fesoterodinu v prostředí methanolu a B-R pufru o  $\text{pH} 7,4$  (1:1, v/v) poskytuje jeden anodický oxidační signál při potenciálu 740 mV. V opačném, katodickém směru není pozorována odpovídající odezva, což značí ireverzibilní děj.

Byla studována stabilita fesoterodinu v neutrálních a alkalických roztocích ( $\text{pH} 7; 9,5$  a 12). Byly zaznamenány cyklické voltamogramy základního elektrolytu ( $\text{CH}_3\text{OH/B-R}$  pufr o daném  $\text{pH}$ , 1:1, v/v), směsi standardu FES a základního elektrolytu (ZE) ihned po smíchání (čas 0 min) a poté v prodlužujících se časových intervalech až do několika hodin po smíchání směsi. V prostředí o  $\text{pH} 7$  v čase 0 min poskytuje FES jeden oxidační signál s maximem při 800 mV. Po 180 min (Obr. 6), a dokonce i po 24 h stání směsi byl pozorován opět jediný anodický pík. S časem však docházelo ke snižování signálu FES v důsledku jeho adsorpce. Adsorpce byla potvrzena následujícím experimentem. Vyleštěná elektroda byla ponechána v roztoku FES po dobu 5 min bez elektrolýzy, poté důkladně opláchnuta destilovanou vodou a bez leštění vložena do roztoku čistého ZE, ve kterém byl pořízen záznam CV. Na voltamogramu byl pozorován pík FES.

Při  $\text{pH} 9,5$  se už po deseti minutách objevuje kromě píku fesoterodinu ( $E_p = 660 \text{ mV}$ ) také pík s potenciálem  $E_p = 480 \text{ mV}$  (Obr. 6), jehož intenzita narůstá s dobou stání směsi k limitní hodnotě proudu píku 80 nA. V prostředí o  $\text{pH} 12$  se kromě píku fesoterodinu při 570 mV objevuje rovněž druhý pík při 370 mV (Obr. 6), jehož signál s časem stání směsi narůstá k limitní hodnotě proudu píku 1,3  $\mu\text{A}$ . Tento pík předcházející signál FES koresponduje s prvním oxidačním signálem 5-HMT (480 mV pro  $\text{pH} 9,5$  a 370 mV pro  $\text{pH} 12$ ). V alkalickém prostředí evidentně dochází k hydrolyze FES na 5-HMT. V neutrálním prostředí dostáváme první oxidační signál 5-HMT při 620 mV, tento pík u FES nebyl pozorován ani po 1080 minutách stání směsi. Z výše uvedených experimentů vyplývá, že v neutrálním prostředí k hydrolyze FES na 5-HMT nedochází.

Obr. 6. Cyklický voltamogram fesoterodinu o koncentraci 0,1 mmol/l v prostředí o různém  $\text{pH}$ : 7, 9,5 a 12. CV základního elektrolytu: methanol/B-R pufr (1:1, v/v, ...), směsi ihned po smíchání FES se základním elektrolytem (- - -) a po 180 min stání směsi (—), rychlost scanu 100 mV/s. →



Závislost rychlosti scanu na anodickou odezvu FES naznačuje děj řízený difúzí. Směrnice lineární  $E_p - \log v$  v závislosti je možné proložit přímkou odpovídá teoretickým předpokladům posunu potenciálu pro jednoelektronovou reverzibilní elektrodovou reakci následovanou ireverzibilní chemickou reakcí nebo ireverzibilní dvouelektronovou reakcí [123].

Oxidace FES je závislá na pH. V kyselém prostředí  $\text{pH} < 5$  a koncentraci FES 0,1 mmol/l nebyla pozorována žádná odezva. Oxidační pík FES se začíná objevovat až při  $\text{pH} 5$ . Proudová odezva tohoto píku roste s alkalitou až do hodnoty  $\text{pH} 7,5$ . Při  $\text{pH} > 7,5$  nemá proudová odezva FES žádný specifický trend a její výška se pohybuje v rozmezí 2,2–2,8  $\mu\text{A}$  pro CV a 0,6–0,8  $\mu\text{A}$  pro DPV. Při  $\text{pH} \geq 9$  se ve voltametričtém záznamu objevuje také pík předcházející odezvu FES. V alkalickém prostředí dochází k hydrolyze FES na 5-HMT (viz výše), tento pík tedy odpovídá prvnímu oxidačnímu píku 5-HMT a se zvyšováním alkality prostředí narůstá jeho odezva. Průsečík dvou lineárních úseků závislosti  $E_p$ – $\text{pH}$  při  $\text{pH} 10,5$  odpovídá disociační konstantě fesoterodinu  $\text{p}K_a = 10,31$  [65].

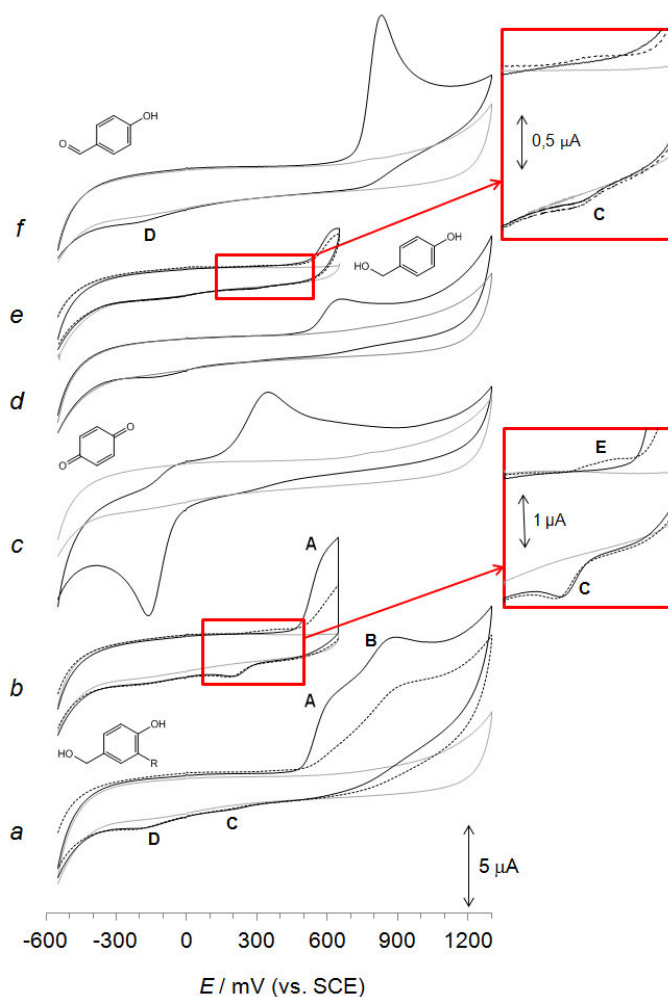
Kalibrační závislost anodické odezvy fesoterodinu byla měřena diferenční pulzní voltametrií v rozsahu koncentrací 10–100  $\mu\text{mol/l}$  v prostředí  $\text{CH}_3\text{OH/B-R}$  pufr  $\text{pH} 7,5$  (1:1, v/v). Závislost proudové odezvy FES na jeho koncentraci byla v měřeném rozsahu lineární. Byla zjištěna mez detekce 14,8  $\mu\text{mol/l}$  a mez stanovitelnosti 21,0  $\mu\text{mol/l}$ . Směrnice kalibrační přímky se směrodatnou odchylkou byla  $(7,08 \pm 0,26) \text{ nA l } \mu\text{mol}^{-1}$  a úsek kalibrační přímky se směrodatnou odchylkou byl  $(-48,8 \pm 15,7) \text{ nA}$  a koeficient determinace 0,9947.

### 1.3. Elektrochemické chování 5-hydroxymethyltolterodinu

Cyklický voltamogram 5-hydroxymethyltolterodinu (Obr. 7 a) v prostředí methanolu a B-R pufru  $\text{pH} 7,5$  (1:1, v/v) ukazuje dva anodické oxidační signály s potenciály 600 mV (pík A) a 860 mV (pík B). V reverzním katodickém záznamu se objevují rovněž dva signály s potenciály 220 mV (pík C) a -170 mV (pík D). Volbou přepínacího potenciálu těsně za maximem píku A (670 mV, Obr. 7 b) podpořené akumulací při 670 mV, dostáváme v katodickém směru intenzivnější pík C a v následujícím anodickém scanu pík E při potenciálu 370 mV (Obr. 7 b). Znamená to, že při potenciálu píku A vzniká elektroaktivní produkt projevující se kvazireverzibilní dvojicí píků C a E ( $E_{p,E} - E_{p,C} = 370 - 220 = 150 \text{ mV}$ ).

Obr. 7. Cyklický voltamogram 5-HMT s přepínacím potenciálem 1,3 V (a) a 650 mV s akumulací 30 s při 650 mV (b), *p*-benzochinonu (c) 4-(hydroxymethyl)fenolu s přepínacím potenciálem 1,3 V (d) a 650 mV (e) a 4-hydroxybenzaldehydu (f). Koncentrace látek 0,5 mmol/l, základní elektrolyt:  $\text{CH}_3\text{OH/B-R}$  pufr  $\text{pH} 7,5$  (1:1, v/v, šedá), 1. cyklus (černá), 2. cyklus (tečkovaná), rychlost scanu 50 mV/s. →

Při potenciálu píku A dochází k jednoelektronové oxidaci 5-HMT za vzniku fenoxyl radikálu, který následně může tvořit C-C dimery (bifenoly) podléhající další oxidaci na příslušný bifenochinon. Redukce bifenochinonu na bifenol se v katodickém směru polarizace projeví píkem C. Redoxní reakce dimerních chinonů jsou reverzibilní a ve druhém anodickém scanu tak dostáváme signál E (Obr. 7 b), při kterém dochází k oxidaci bifenolu na bifenochinon. Pík D, který



se objevuje na katodické větvi cyklického voltamogramu 5-HMT, leží při stejném potenciálu (-170 mV) jako redukční pík *p*-benzochinonu (Obr. 7 c). Intenzita tohoto píku je větší při zvoleném přepínacím potenciálu pozitivnějším, než je potenciál píku B. Je tedy možné, že ve druhém stupni oxidace 5-HMT (pík B), je oxidován příslušný fenoxo radikál na fenoxoniový kation. Ten může reagovat s vodou za vzniku odpovídajícího diolu, který se dále oxiduje na chinon. Redukce tohoto chinonu se projevuje píkem D.

Je pravděpodobné, že současně s tvorbou fenoxo radikálu dochází v prvním oxidačním kroku 5-HMT k oxidační dehydrogenaci 5-hydroxymethylové skupiny na aldehydickou skupinu za vzniku 5-formyl derivátu TOL. Podobné chování je pozorováno u standardu 4-(hydroxymethyl)fenolu (Obr. 7 d). Na tomto voltamogramu jsou také pozorovatelné dva redukční píky odpovídající nejspíše stejnému ději, jako u píků C a D 5-HMT, tj. redukci bifenochinonu a chinonu. Při nižším přepínacím potenciálu je pík C intenzivnější (Obr. 7 e), naopak pík D má větší intenzitu při vyšším přepínacím potenciálu, podobně jako u 5-HMT. V literatuře je popsáno podobné chování benzylalkoholu, který je elektrochemicky oxidován na benzaldehyd [127] nebo oxidace *p*-kresolu přes 4-hydroxymethylfenol až konečný produkt *p*-hydroxybenzaldehyd katalyzovaná *p*-kresolmethylhydroxylasou reaktivovanou elektrochemicky in situ [128].

V dalším oxidačním kroku, který se projevuje píkem B lze předpokládat oxidaci 5-formyl derivátu TOL, což potvrzuje shoda potenciálu píku B s oxidačním signálem píku standardu 4-hydroxybenzaldehydu (Obr. 7 f). Redukční pík na cyklickém voltamogramu při potenciálu kolem -200 mV, analogický k píku D na voltamogramu 5-HMT, odpovídá s velkou pravděpodobností redukci příslušného chinonu. Z literatury [129] je známo, že redukce aldehydické skupiny probíhá až při mnohem nižších potenciálech, například formaldehyd se redukuje při  $E_{1/2} = -1,46$  V, benzaldehyd při  $E_{1/2} = -1,50$  V nebo nitrobenzaldehyd při  $E_{1/2} = -0,80$  V (všechny v prostředí o pH = 8). Můžeme očekávat, že na uhlíkové elektrodě v použitém potenciálovém rozsahu za daných podmínek nebude redukce aldehydické skupiny probíhat.

Závislost rychlosti scanu v rozsahu 5 – 700 mV/s na proudovou odezvu píku A 5-HMT naznačuje děj řízený difúzí. Závislost  $E_p - \log v$  lze proložit přímkou se směrnicí a směrodatnou odchylkou ( $40,1 \pm 3,2$ ) mV/log jednotku. Pro ireverzibilní elektrodovou reakci z teorie plyne posun potenciálu píku  $30/\alpha n$  (mV) při 25 °C při desetinásobném zvýšení rychlosti scanu.

Oxidace 5-hydroxymethyltolterodinu je silně závislá na pH. Oxidační signál píku A se začíná objevovat až v mírně kyselém prostředí. Se zvyšováním pH elektrolytu se jeho odezva zvyšuje a v silně alkalickém prostředí je nejintenzivnější. Odezva oxidačního píku B je zaznamenatelná v širším rozsahu pH 2,75 – 11,64. Od pH 2,75 jeho odezva se zvyšováním pH roste, svého maxima dosahuje při pH 8 a pro pH > 8 intenzita klesá. Ze závislosti potenciálu anodických odezev 5-HMT na pH je evidentní posun všech píků k nižším hodnotám potenciálu s rostoucím pH. Závislostmi  $E_p - \text{pH}$  napovídá, že první a druhý oxidační stupeň zahrnují stejný počet protonů a elektronů.

## 2. Separace antimuskarinik vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí

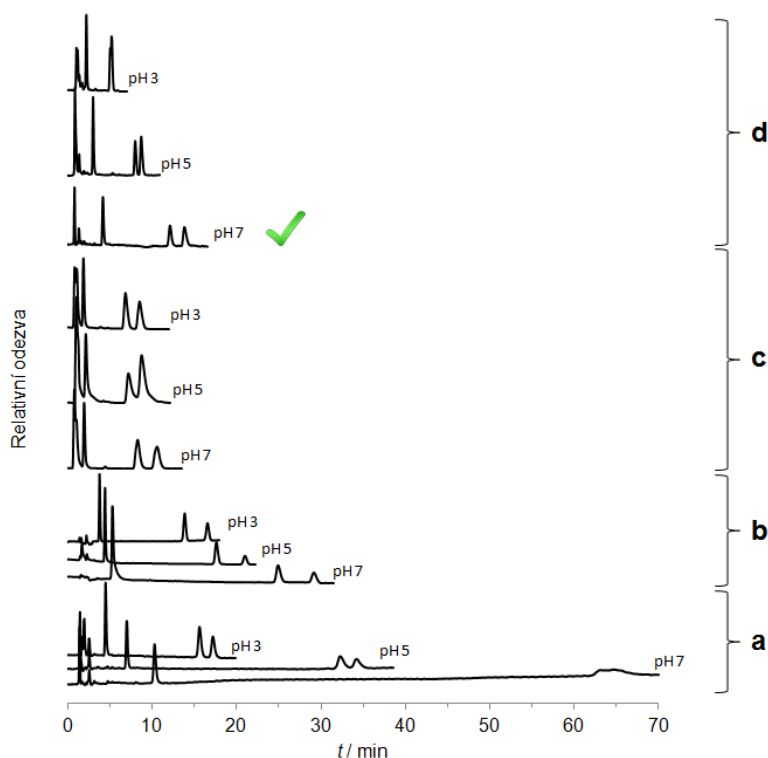
Oxidace TOL, FES a 5-HMT byla analyticky využita při elektrochemické detekci po separaci těchto látek vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Pro analýzu léčiv a jejich metabolitů ve složitých maticích, např. tělních tekutinách, je separace nezbytným krokem.

Separace studovaných látek byla testována na čtyřech různých kolonách: Ascentis® C<sub>18</sub> (3 μm, 100 × 2,1 mm), Nucleodur® C<sub>8</sub> Gravity (5 μm, 250 × 2 mm), Nucleodur® PFP (5 μm, 250 × 2 mm) a Nucleodur® CN-RP (3 μm, 125 × 2 mm, Obr. 8). Látky byly z kolon vymývány v tomto elučním pořadí 5-HMT, TOL a FES. Pouze u CN-kolony došlo k výměně elučního pořadí mezi TOL a FES. Z hlediska přiměřené retence a separace látek se jako mobilní fáze osvědčila směs acetonitril/fosfátový

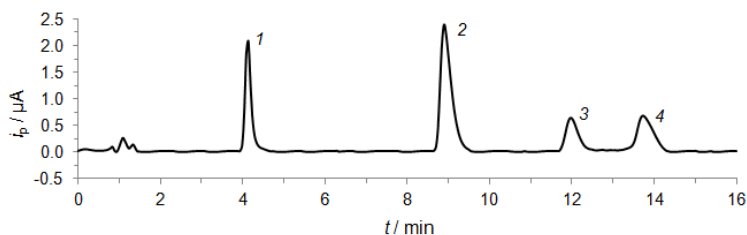


pufr o pH 7 a koncentraci 0,05 mol/l v poměru 30:70, v/v. S ohledem na případnou aplikaci metody - detekci studovaných antimuskarinik v plazmě a moči, kde jsou v prvních minutách analýzy eluovány matriční látky, bylo cílem najít kolonu a pH mobilní fáze, při kterém bude mít 5-HMT co nejdelší retenci a zároveň TOL a FES retenci co nejkratší, ovšem s rozlišením  $R_n \geq 1$ . Těmto požadavkům nejlépe vyhovovala kolona Nucleodur<sup>®</sup> CN-RP při pH 7 (Obr. 8). Retenční faktor  $k_1$  (pro 5-HMT) zde dosáhl uspokojivé hodnoty 2,82 a zároveň celková doba analýzy nepřekročila 15 min. Tento systém středně polární nitrilové stacionární fáze částečně potlačuje rozdíly v polaritě studovaných látek. Ve srovnání s ostatními kolonami polárnější 5-HMT je stacionární fází CN-kolony zadržován déle a méně polární TOL a FES jsou zadržovány kratší dobu.

Obr. 8. Chromatogramy tří antimuskarinik separovaných na čtyřech různých kolonách s mobilní fází CH<sub>3</sub>CN/fosfátový pufr o koncentraci 0,05 mol/l (30:70, v/v) o třech různých pH (3, 5 a 7). Látky vycházely v elučním pořadí 5-HMT, TOL a FES z kolony Nucleodur<sup>®</sup> PFP (a), Nucleodur<sup>®</sup> C<sub>8</sub> Gravity (b) a Ascentis<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (c). Pro kolonu Nucleodur<sup>®</sup> CN-RP (d) bylo eluční pořadí: 5-HMT, FES a TOL. Podmínky separace: průtok mobilní fáze: 0,3 ml/min, UV detekce:  $\lambda = 210$  nm. →



Volba pracovní elektrody byla prvním důležitým bodem pro aplikaci elektrochemické detekce. Byla testována coulometrická cela s porézním grafitickým uhlíkem. Vlastnosti tohoto elektrodového materiálu dovolují maximální aplikovaný potenciál 800 mV. Při tomto potenciálu 5-HMT a TOL dávaly dobrý signál, naopak FES neposkytoval analyticky využitelnou odezvu. Za použití BDD elektrody při 1500 mV byla odezva fesoterodinu srovnatelná se signály ostatních látek. Z výše uvedených důvodů byla pro další experimenty zvolena amperometrická detekce s BDD elektrodou zapojená v sérii před referenční UV-Vis detektor.



Obr. 9. Chromatogram modelové směsi 5-HMT (1), vnitřního standardu BER (2), FES (3) a TOL (4) o koncentraci 10 μmol/l. HPLC parametry: kolona Nucleodur<sup>®</sup> CN-RP, mobilní fáze CH<sub>3</sub>CN/fosfátový pufr pH 7 o koncentraci 0,05 mol/l (30:70, v/v), amperometrický detektor s BDD elektrodou s potenciálem 1,7 V.

Pro případnou aplikaci metody stanovení 5-HMT, TOL a FES v moči a plazmě byl hledán vnitřní standard (IS), který by poskytoval výbornou elektrochemickou odezvu a zároveň by byl dobře separován od všech tří studovaných látek. Nejlépe těmto chromatografickým a elektrochemickým podmínkám vyhovoval isochinolinový alkaloid berberin (BER, Obr. 9), jehož elektrochemické chování již bylo dobře popsáno [25]. Základní chromatografické parametry vyvinuté metody jsou shrnuty v *Tabulce 1*.

Byly naměřeny hydrodynamické voltamogramy studovaných antimuskarinik a berberinu na koloně Nucleodur® CN-RP, s mobilní fází CH<sub>3</sub>CN/fosfátový pufr pH 7 o koncentraci 0,05 mol/l (30:70, v/v) a amperometrickým detektorem s BDD elektrodou. Potenciál byl zvyšován po 70 mV v rozsahu od 0,7 V do 1,47 V. Z voltamogramů je vidět, že FES začíná dávat elektrochemickou odezvu až při 1,19 V a se zvyšujícím se potenciálem jeho odezva rapidně narůstá. Signály TOL a 5-HMT se zvyšováním aplikovaného potenciálu narůstají pozvolna, což je v souladu s průběhy cyklických voltamogramů obou látek, které vykazují dva, resp. tři oxidační signály. Naproti tomu FES se oxiduje pouze v jednom kroku, proto i nárůst proudu v hydrodynamickém voltamogramu je strmější. Rozdíly mezi potenciály, při kterých je dosaženo limitních hodnot proudů pro jednotlivé analyty, korespondují s rozdíly potenciálů CV píků z voltametričeských analýz.

*Tabulka 14 Chromatografické charakteristiky 5-HMT, FES, TOL a vnitřního standardu (IS) berberinu za zvolených podmínek*

Látka	$k \pm s_k$	$R_n \pm s_R$
5-HMT	2,81 ± 0,01	-
IS	7,17 ± 0,02	13,29 ± 0,31
FES	9,98 ± 0,03	5,88 ± 0,10
TOL	11,58 ± 0,03	2,72 ± 0,04

$k$  – retenční faktor,  $R_n$  – rozlišení sousedících dvojic píků,  $s_n$  – směrodatná odchylka ze tří měření,  $t_M \pm s_{t_M} = (1,09 \pm 0,01)$  min, průtok mobilní fáze: 0,3 ml/min, elektrochemická detekce při 1,7 V, koncentrace látek: 10 μmol/l.

Na základě analýzy vzorků standardů na nízkých koncentračních hladinách byly odhadnuty meze detekce látek, kdy signál vzorku odpovídal přibližně trojnásobku šumu slepého pokusu. Pro 5-HMT odpovídala mez detekce 3 nmol/l, pro fesoterodin 9 nmol/l a pro tolterodin 2 nmol/l. Koncentrace studovaných léčiv v lidské plazmě se pohybuje v jednotkách až desítkách nmol/l [68], v moči je koncentrace vyšší vzhledem k tomu, že většina léčiva je z těla vylučována právě močí (v metabolizované, či nezměněné podobě) [64]. Lze předpokládat, že navrhovaná metoda se může stát součástí postupu pro stanovení těchto léčiv v plazmě nebo moči. Pro použití metody ke stanovení látek v moči nebo plazmě by však bylo nutné provést kalibraci látek v odpovídající matici.

### 3. Elektrolýza antimuskarinik a analýza jejich oxidačních produktů metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Pro detailnější charakterizaci oxidačních produktů tolterodinu, fesoterodinu a jejich metabolitu 5-hydroxymethyltolterodinu byly provedeny série experimentů elektrolýzy za konstantního potenciálu na velkoplošné platinové elektrodě. Potenciál elektrooxidace byl zvolen na základě cyklických voltamogramů TOL, FES a 5-HMT zaznamenaných v různých prostředích (*Tabulka 2*). Elektrolyzáty byly následně analyzovány metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (UPLC/MS) s ionizací elektrosprejem a hybridním Q-TOF analyzátozem.

*Tabulka 15 Přehled zvolených prostředí a aplikovaných potenciálů při elektrolýze pro tolterodin, fesoterodin a 5-hydroxymethyltolterodin.*

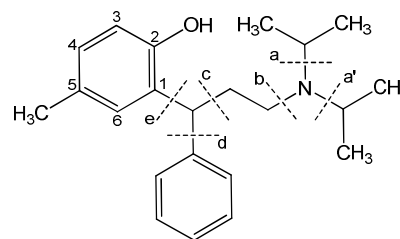
Látka	Prostředí	Potenciál elektrolýzy (mV)
TOL	CH <sub>3</sub> CN s 12,5 mmol/l LiClO <sub>4</sub>	200, 700, 1000
	CH <sub>3</sub> OH s 90 mmol/l CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	200, 700, 1000
	CH <sub>3</sub> OH/B-R pufr pH 3,5	500, 690 a 860
	CH <sub>3</sub> OH/B-R pufr pH 7,0	200, 430, 580 a 730
	CH <sub>3</sub> OH/B-R pufr pH 10,0	100, 280, 500 a 610
FES	CH <sub>3</sub> OH/B-R pufr pH 3,0	500, 1000 a 1150
	CH <sub>3</sub> OH/B-R pufr pH 7,0	200, 600 a 1000
5-HMT	CH <sub>3</sub> OH/B-R pufr pH 3,0	650 a 900
	CH <sub>3</sub> OH/B-R pufr pH 7,0	300, 500, 900
	CH <sub>3</sub> OH/B-R pufr pH 9,0	300, 500, 900

Níže jsou diskutována hmotnostní spektra, ve kterých lze přisoudit jednotlivým iontům uvedené ztráty, resp. jejich kombinace. Procesy fragmentace látek nebyly detailněji studovány. Jejich popis slouží k podpoře předpokládaných struktur, přičemž jejich jednoznačná verifikace by byla možná porovnáním získaných spekter se spektry standardů, které však nejsou pro řadu produktů studovaných elektrochemických přeměn k dispozici. Hmotnostní spektra však v kontextu znalostí elektrochemického chování poskytují další podpůrné informace užitečné pro pochopení zkoumaných procesů.

### 3.1. Elektrolyza tolterodinu

Elektrolyza tolterodinu byla prováděna ve směsném prostředí CH<sub>3</sub>OH/B-R pufr (1:1, v/v), ale také v nevodných prostředích, která byla zvolena k potlačení adsorpce oxidačních produktů na elektrodový povrch. Pro rozlišení produktů vznikajících elektrolyzou od případných dalších „neelektrolytických“ produktů byly chromatogramy a hmotnostní spektra srovnány s kontrolními roztoky TOL, které byly elektrolyzovány při nižším potenciálu, než je potenciál prvního anodického píku: 500 mV pro pH 3,5; 200 mV pro pH 7,0; 100 mV pro pH 10,0 a 200 mV pro nevodná prostředí. Za těchto podmínek by neměly probíhat žádné elektrochemické reakce tolterodinu.

UPLC/MS analýzou vzorků tolterodinu byl zaznamenán pik s retenčním časem  $t_R = 2,8$  min odpovídající protonované molekule  $[M + H]^+$  s  $m/z$  326, která náleží tolterodinu. Tolterodin byl fragmentován (Obr. 10, Obr. 11 a) na ionty s  $m/z$  284 (ztráta propenu štěpením vazby a nebo a'),  $m/z$  197 (ztráta diisopropylaminu a ethenu štěpením vazeb b, c) a  $m/z$  147, ion s nejintenzivnějším píkem spektra, vznikl ztrátou diisopropylaminu, ethenu a benzenu štěpením vazeb b, c, d. Při fragmentaci dochází také ke štěpení vazby e za vzniku iontů s  $m/z$  117 (kombinace štěpení vazeb b, e) a  $m/z$  91 (kombinace štěpení vazeb b, c, e). Fragmentační spektrum tolterodinu je v souladu se spektrem uvedeným v literatuře [68].



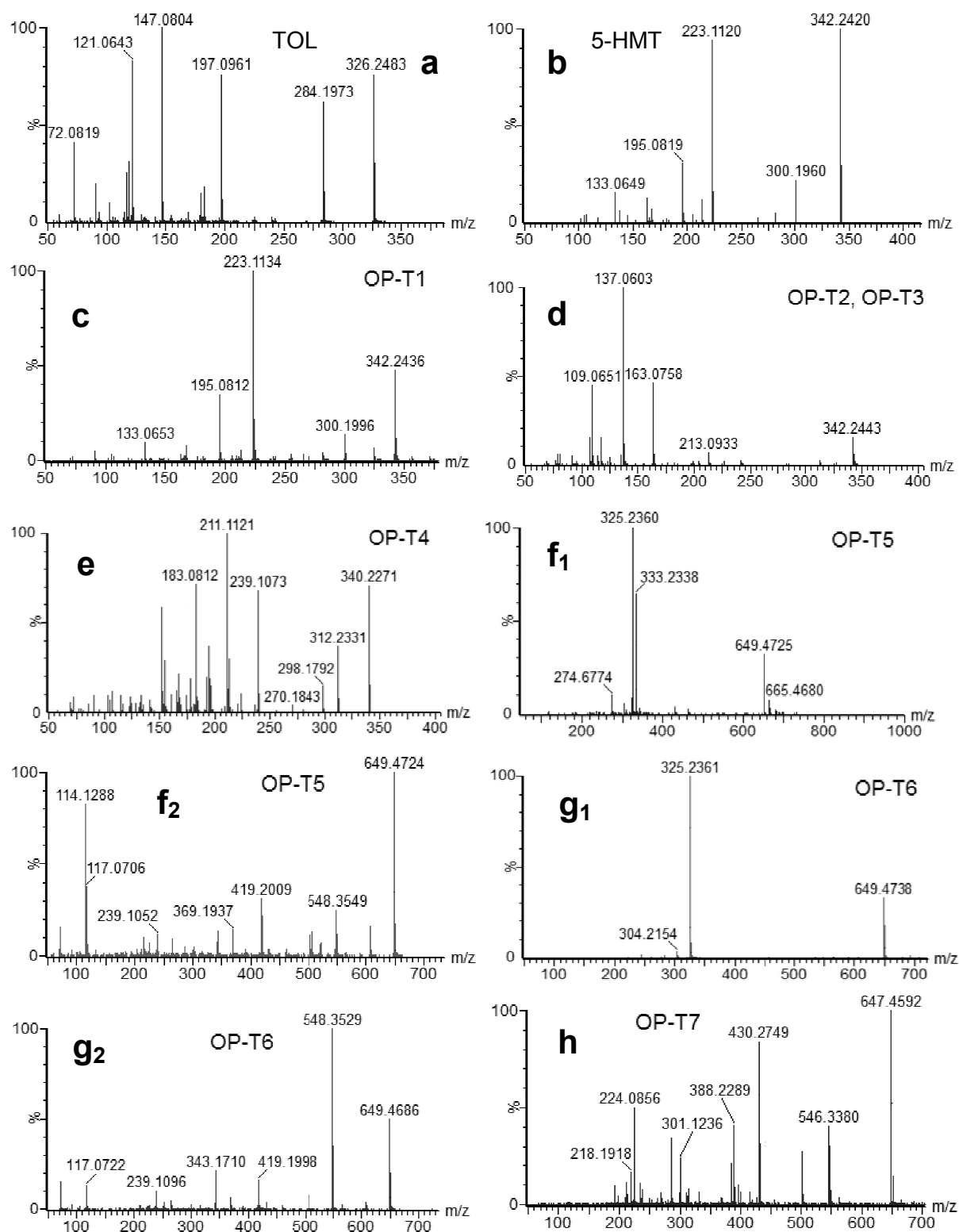
Obr. 10. Naznačení fragmentace tolterodinu

Elektrolyza všech vzorků tolterodinu při potenciálu voltametrického píku A vedla podle UPLC/MS analýzy ke vzniku produktu OP-T1. Hmotnostní spektrum této látky (Obr. 11 b) obsahuje stejné fragmentační ionty jako spektrum standardu 5-HMT (Obr. 11 c). Retenční časy OP-T1 a 5-HMT ( $t_R = 2,0$  min) se také shodují (Tabulka 3). Největší množství tohoto produktu bylo nalezeno v prostředí acetonitrilu a v pufovaném kyselém prostředí. Podle výše uvedených faktů byl elektrolyzou TOL získán jeho hlavní aktivní metabolit 5-HMT.

Další dva polární produkty OP-T2 ( $t_R = 1,9$  min) a OP-T3 ( $t_R = 2,1$  min) byly nalezeny ve větším množství ve vzorcích v prostředí CH<sub>3</sub>CN elektrolyzovaných při potenciálu 1 V. Spektra obou produktů jsou identická (Obr. 11 d) s iontem prekurzoru  $m/z$  342 stejně jako u 5-HMT (Tabulka 3). Nejintenzivnější fragmentový ion s  $m/z$  137, který vznikl ztrátou diisopropylaminu, ethynu a benzenu, nese dva atomy kyslíku na benzenovém jádře. Tento fakt napovídá, že OP-T2 a OP-T3 mohou být polohové izomery hydroxyderivátů tolterodinu s hydroxyskupinami vázanými na methylbenzenový kruh nejpravděpodobněji v polohách 4 a 6 (Schéma 1, str. 28). Separace tří izomerů s  $m/z$  342 byla zobrazena pomocí jejich nejintenzivnějších fragmentů  $m/z$  223 pro OP-T1 a  $m/z$  137 pro OP-T2 a OP-T3.

Produkt OP-T4 ( $t_R = 2,3$  min,  $m/z$  340) byl nalezen v roztoku elektrolyzovaném při potenciálu píku B v prostředí acetonitrilu a kyselém pufovaném prostředí. Ve fragmentačním spektru (Obr. 11 e) je intenzivní ztráta CO ( $\Delta 28$ ) projevující se fragmentovým iontem s  $m/z$  312, která u TOL ani 5-HMT není vidět. Nejintenzivnější fragmentový pik spektra s  $m/z$  211 pak odpovídá ztrátě CO a diisopropylaminu. Navíc stejný produkt vzniká také oxidací standardu 5-HMT, jak je popsáno níže

(odd. 3.3). Podle sumárního vzorce a typické ztráty CO může být produktem OP-T4 5-formyl tolterodin.



Obr. 11. MS spektra tolterodinu (a), 5-hydroxymethyltolterodinu (b) a oxidačních produktů TOL: OP-T1 (c) OP-T2 a OP-T3 (d), OP-T4 (e), OP-T5 (f<sub>1,2</sub>), OP-T6 (g<sub>1,2</sub>) a OP-T7 (h) změřené po elektrolýze při 0,7 V (OP-T1, OP-T5, OP-T6 a OP-T7) a při 1,0 V (OP-T2, OP-T3 a OP-T4) na Pt-elektrodě v roztoku CH<sub>3</sub>CN/LiClO<sub>4</sub>. Spektra byla získána za použití rampy kolizní energie 15–35 eV s předešlou separací iontu (a, b, e, f<sub>2</sub>, g<sub>2</sub>), bez předešlé separace iontu (c, d, h), nebo při nižší kolizní energii 5 eV (f<sub>1</sub>, g<sub>1</sub>).

Kromě výše zmíněných produktů byly ve všech elektrolyzovaných roztocích nalezeny také dimerní produkty OP-T5 ( $t_R = 4,4$  min) a OP-T6 ( $t_R = 5,0$  min), které mají protonovanou molekulu s  $m/z$  649. Nejintenzivnější pík ( $m/z$  325) hmotnostního spektra obou látek pořízených při nižší kolizní energii (Obr. 11  $f_1, g_1$ ) náleží dvakrát protonované molekule  $[M + 2H]^{2+}$ . Oba dimery vznikly spojením dvou fenoxyl radikálů, produktů jednoelektronové oxidace TOL. Produkt OP-T5 je polárnější, mohl by s větší pravděpodobností vznikat vazbou C–C, zatímco méně polární OP-T6 spíše přes vazbu C–O (Schéma 1, str. 28). Ve fragmentačních spektrech těchto dvou dimerů (Obr. 11  $f_2, g_2$ ) lze pozorovat fragmentační ionty se stejnými  $m/z$ , ale s různými intenzitami. S produktem OP-T5 koeluuje látka odpovídající pravděpodobně dimeru vzniklému spojením fenoxyl radikálů TOL a 5-HMT ( $[M + H]^+$   $m/z$  665,  $[M + 2H]^{2+}$   $m/z$  333, Obr. 11  $f_1$ ).

Další dimerní produkt OP-T7 ( $t_R = 4,3$  min,  $m/z$  647,  $[M + 2H]^{2+}$   $m/z$  324) byl identifikován v elektrolyzátu v prostředí acetonitrilu (Obr. 11 h). Rozdíl přesných hmotností OP-T5 a OP-T7 (Tabulka 3) odpovídá ztrátě dvou atomů vodíku u OP-T7. Produkt OP-T7 tedy může vznikat elektrooxidací OP-T5. Nižší polarita OP-T7 než OP-T5 podporuje toto tvrzení (Schéma 1, str. 28).

Vedle uvedených hlavních oxidačních produktů tolterodinu byly nalezeny v malém množství také vedlejší produkty, které vznikají reakcí s rozpouštědlem. Během elektrolýzy v prostředí  $CH_3CN/LiClO_4$  vznikl acetamidací [130] produkt s protonovanou molekulou s  $m/z$  383 ( $t_R = 1,8$  min). Podobně elektrolýzou v kyselém vodně methanolickém prostředí vzniká produkt s  $m/z$  356 ( $t_R = 2,5$  min), který odpovídá methoxyderivátu tolterodinu.

Tabulka 16 UPLC/MS charakteristiky tolterodinu a jeho oxidačních produktů

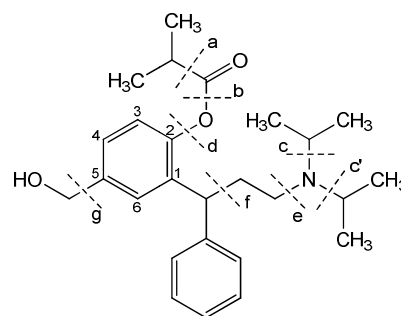
Látka	$t_R$ (min)	$[M + H]^+$ ( $m/z$ )	Sumární vzorec	Chyba (ppm)
Tolterodin	2,8	326,2483	$C_{22}H_{32}NO$	-0,3
5-HMT	2,0	342,2420	$C_{22}H_{32}NO_2$	-3,8
OP-T1	2,0	342,2436	$C_{22}H_{32}NO_2$	0,9
OP-T2	1,9	342,2443	$C_{22}H_{32}NO_2$	2,9
OP-T3	2,1	342,2436	$C_{22}H_{32}NO_2$	0,9
OP-T4	2,3	340,2271	$C_{22}H_{30}NO_2$	-1,8
OP-T5 (dimer)	4,4	649,4724	$C_{44}H_{61}N_2O_2$	-1,4
OP-T6 (dimer)	5,0	649,4686	$C_{44}H_{61}N_2O_2$	-7,2
OP-T7 (dimer)	4,3	647,4592	$C_{44}H_{59}N_2O_2$	2,3

$t_R$  – retenční čas, Chyba – relativní rozdíl mezi teoreticky vypočtenou hmotností iontu a experimentálně získanou

### 3.2. Elektrolýza fesoterodinu

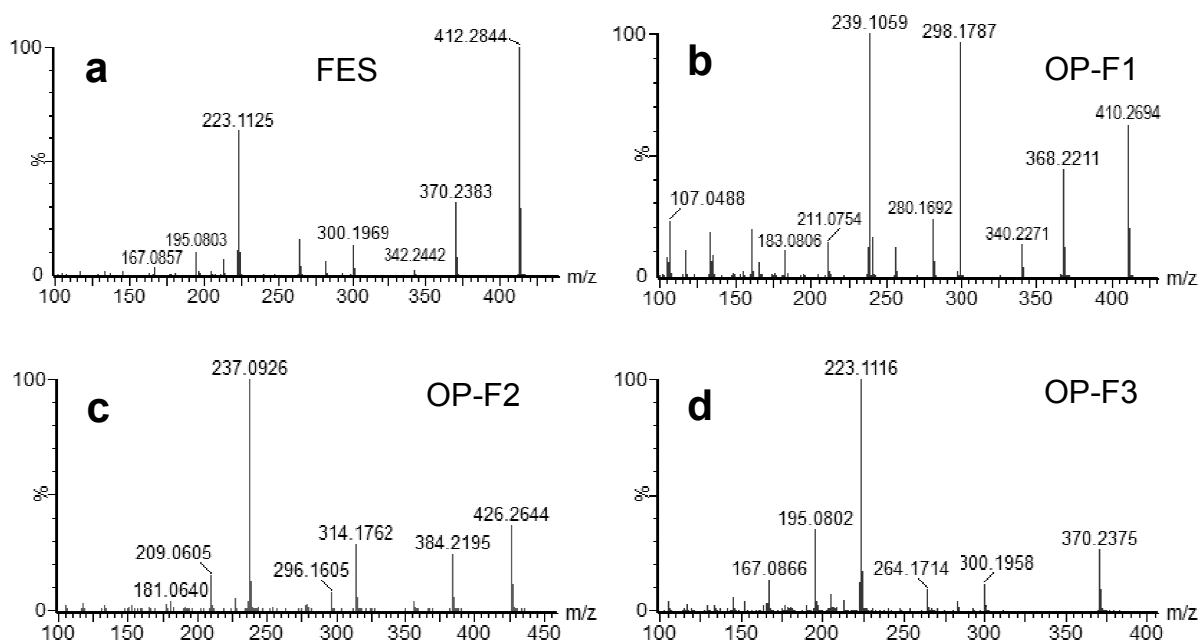
Fesoterodin byl elektrolyzován v prostředích  $CH_3OH/B-R$  pufr (1:1, v/v) pH 3,0 a 7,0. Použití vyššího pH pro elektrolýzu FES bylo vyloučeno z důvodu jeho samovolné hydrolyzy na 5-HMT v alkalickém prostředí (viz kapitola 1.2). Pro rozlišení produktů vznikajících elektrolýzou od případných dalších „neelektrolytických“ produktů byly chromatogramy a hmotnostní spektra srovnány s daty pro kontrolní roztoky FES, které byly elektrolyzovány při nižším potenciálu, než je potenciál prvního anodického píku: 500 mV pro pH 3,0 a 200 mV pro pH 7,0. Za těchto podmínek by neměly probíhat žádné elektrochemické reakce fesoterodinu. UPLC/MS analýzou elektrolyzovaných vzorků a standardu FES byl zaznamenán pík s retenčním časem  $t_R = 3,0$  min protonované molekuly  $[M + H]^+$   $m/z$  412, která náleží fesoterodinu. Jeho fragmentace (Obr. 12, Obr. 13 a) poskytuje ionty:  $m/z$  370 (štěpení vazby a nebo c),  $m/z$  342 (štěpení vazeb a, b, event. přímo b),  $m/z$  300 (štěpení vazeb a–c, event. b, c),  $m/z$  282 (štěpení vazeb a–d, event. přímo d), nejintenzivnější pík spektra pík spektra s  $m/z$  223 (štěpení vazeb a–e, event. e, d),  $m/z$  195 (štěpení vazeb a–f, event. d, f) a ion s  $m/z$  167 (a–g, event. d, f, g). Eventuality štěpení vazeb nastávají podobně u produktů oxidace FES.

U všech elektrolyzovaných vzorků FES byl v retenčním čase  $t_R = 3,3$  min nalezen produkt OP-F1, přičemž výrazně větší množství této látky bylo získáno elektrolyzou při vyšších hodnotách potenciálu (1,15 V pro pH 3,0 a 1 V pro pH 7,0). Podle sumárního vzorce (Tabulka 4) má tento produkt o dva atomy vodíku méně než FES. Analogicky k produktu oxidace TOL OP-T4 (5-formyl tolterodinu), může být OP-F1 5-formyl fesoterodin. Nejintenzivnější pík jeho fragmentačního spektra s  $m/z$  239 (Obr. 13 b) odpovídá ztrátě propenu, CO (event. 2-methylprop-1-en-1-onu) a diisopropylaminu. Na rozdíl od FES nedochází v případě OP-F1 ke ztrátě  $H_2O$ , což naznačuje jinou substituci v poloze 5 (místo hydroxymethylu aldehydická skupina).



Obr. 12. Naznačení fragmentace fesoterodinu

Produkt OP-F2 s retenčním časem  $t_R = 2,5$  min a protonovanou molekulou  $[M + H]^+$  s  $m/z$  426 je polárnější než fesoterodin a vzniká v kyselém i neutrálním prostředí především při vyšších potenciálech (1,15 V pro pH 3,0; 1 V pro pH 7,0). Podle sumárního vzorce (Tabulka 4) má OP-F2 oproti FES o dva atomy vodíku méně a jeden atom kyslíku navíc. Nejintenzivnější fragmentový ion jeho spektra (Obr. 13 c) s  $m/z$  237 odpovídá, stejně jako u FES štěpení vazeb a–e, event. d, e. Ve spektru je pozorovatelný fragmentový ion s  $m/z$  153, který odpovídá ztrátě diisopropylaminu, ethenu, kyseliny isomáselné a dvou molekul CO, což potvrzuje přítomnost čtyř atomů kyslíku ve struktuře produktu OP-F2. Výše uvedená fakta napovídají, že produkt OP-F2 by mohl vznikat hydroxylací produktu OP-F1. Nejpravděpodobněji by se hydroxyskupina mohla vázat na substituované benzenové jádro do polohy 3 (Schéma 2, str. 28).



Obr. 13. MS spektrum standardu fesoterodinu (a) a jeho produktů oxidace: OP-F1 (b), OP-F2 (c), OP-F3 (d) změřené po elektrolyze FES při 1 V na Pt-elektrodě v prostředí o pH 7,0. Spektra byla získána za použití rampy kolizní energie 15–35 eV s předěšlou separací iontu spektra.

Produktu OP-F3 bylo nalezeno největší množství v neutrálním prostředí při potenciálu elektrolyzy 1 V. Retenční čas této látky s protonovanou molekulou  $[M + H]^+$  s  $m/z$  370 je  $t_R = 2,7$  min. Totožnou hmotnost s přesností na dvě desetinná místa a shodné elementární složení má rovněž druhý nejintenzivnější fragmentový ion FES. Navíc fragmentové ionty  $MS^2$  spektra tohoto produktu (Obr. 13 d) jsou shodné s fragmentovými ionty FES  $< m/z$  370 (Obr. 13 a). Látka se stejnou molární hmotností byla nalezena jako produkt degradace FES působením UV-C záření (100–280 nm),

kde došlo k *N*-dealkylaci, odtržení isopropylové skupiny z dusíku. Fotodegradace látky bývá nejčastěji způsobena oxidací nebo rozpadem některé slabé chemické vazby [131]. Podle výše uvedených faktů produkt OP-F3 velmi pravděpodobně vznikl *N*-dealkylací FES (Schéma 2, str. 28).

Tabulka 17 UPLC/MS charakteristiky fesoterodinu a jeho oxidačních produktů

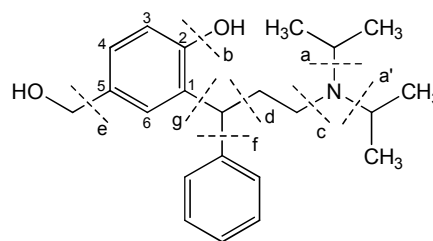
Látka	$t_R$ (min)	$[M + H]^+$ ( $m/z$ )	Sumární vzorec	Chyba (ppm)
Fesoterodin	3,0	412,2844	$C_{26}H_{38}NO_3$	-1,9
OP-F1	3,3	410,2694	$C_{26}H_{36}NO_3$	-0,2
OP-F2	2,5	426,2644	$C_{26}H_{36}NO_4$	0,0
OP-F3	2,7	370,2375	$C_{23}H_{32}NO_3$	-1,9

$t_R$  – retenční čas, Chyba – relativní rozdíl mezi teoreticky vypočtenou hmotností iontu a experimentálně získanou

### 3.3. Elektrolýza 5-hydroxymethyltolterodinu

Elektrolýza 5-hydroxymethyltolterodinu byla prováděna v prostředích  $CH_3OH/B-R$  pufr (1:1, v/v) pH 3,0; 7,0 a 9,0. Pro rozlišení produktů vznikajících elektrolýzou od případných dalších „neelektrolytických“ produktů byly chromatogramy a hmotnostní spektra srovnány s daty pro kontrolní roztoky 5-HMT, které byly elektrolýzovány při nižším potenciálu, než je potenciál prvního anodického píku: 650 mV pro pH 3,0 a 300 mV pro pH 7,0 a 9,0. Za těchto podmínek by neměly probíhat žádné elektrochemické reakce 5-HMT.

UPLC/MS analýzou standardu a elektrolýzovaných vzorků 5-HMT byl zaznamenán pík s retenčním časem  $t_R = 2,0$  min a protonovanou molekulou  $[M + H]^+$   $m/z$  342 náležící 5-HMT. Jeho fragmentace (Obr. 15 a) je naznačena na Obr. 14.



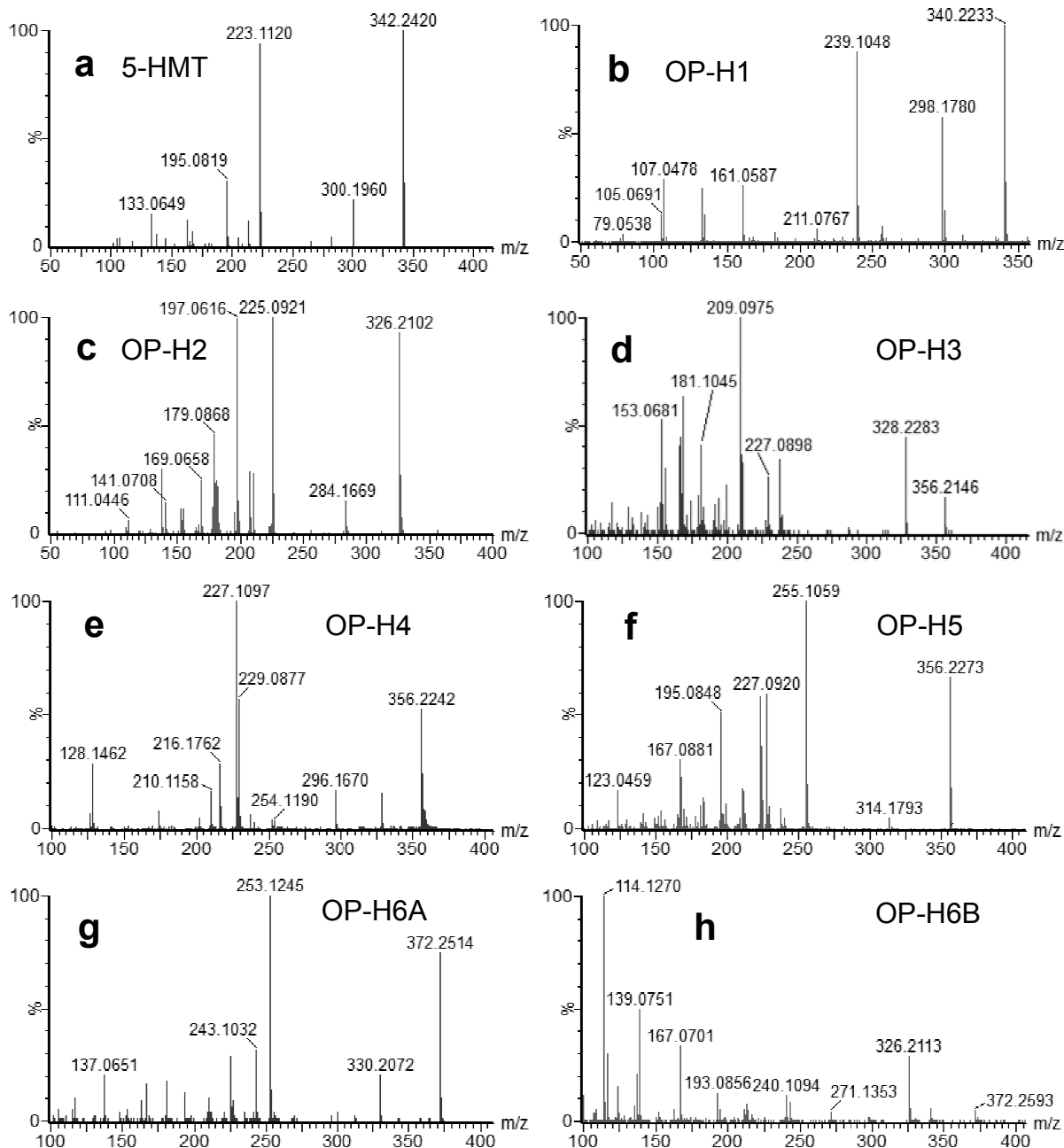
Obr. 14. Naznačení fragmentace 5-hydroxymethyltolterodinu

#### Produkt elektrolýzy 5-HMT s $m/z$ 340

Elektrolýza všech vzorků 5-HMT při potenciálu píku A vedla podle UPLC/MS analýzy ke vzniku produktu OP-H1 s retenčním časem  $t_R = 2,3$  min (Tabulka 5) a protonovanou molekulou  $[M + H]^+$   $m/z$  340. Nejintenzivnější fragmentový ion spektra (Obr. 15 b).  $m/z$  239 odpovídá ztrátě diisopropylaminu. U produktu OP-H1 nebyly pozorovány ztráty, které by naznačovaly přítomnost 5-hydroxymethylové skupiny (ztráta vody nebo formaldehydu nebo methanolu). Oxidací 5-HMT mohlo dojít k dehydrogenaci 5-hydroxymethylové skupiny na aldehydickou skupinu (Schéma 3, str. 29). Tuto hypotézu podporují výsledky voltametrických analýz (odd. 1.3), které také ukazují na vznik 5-formyl tolterodinu v prvním oxidačním kroku 5-HMT. Stejná látka byla nalezena při oxidaci tolterodinu (OP-T4) popsaného výše, jedná se pravděpodobně o sekundární produkt oxidace TOL.

#### Produkt elektrolýzy 5-HMT s $m/z$ 326

Při elektrolýze 5-HMT v kyselém a neutrálním prostředí byl v čase  $t_R = 2,4$  min zaznamenán produkt OP-H2 se stejnou hmotností jako TOL ( $m/z$  326), avšak jejich fragmentační spektra (Obr. 11 a, Obr. 15 c) a retenční časy se značně liší (Tabulka 3 a Tabulka 5). Větší množství produktu OP-H2 vzniká při vyšších potenciálech. Voltametrickými experimenty byl zjištěn vznik *p*-benzochinonu v molekule 5-HMT ve druhém oxidačním kroku (B) 5-HMT. Této látce odpovídá hmotnost  $m/z$  326. V hmotnostním spektru produktu OP-H2 (Obr. 15 c) je pozorovatelná ztráta dvou CO, které se mohly odtrhnout právě z *p*-benzochinonu (Schéma 3, str. 29). Tato hypotéza je také podpořena shodou maxim UV-Vis spekter produktu OP-H2 (250 nm, 295 nm a 330 nm) pořízeného simultánně se záznamem MS spektra na PDA detektoru a naměřeného UV-Vis spektra standardu *p*-benzochinonu v prostředí voda/methanol (1:1, v/v).



Obr. 15. MS spektrum standardu 5-HMT (a) a jeho oxidačních produktů: OP-H1 (b), OP-H2 (c), OP-H3 (d), OP-H4 (e), OP-H5 (f), OP-H6A (g) a OP-H6B (h) změřené po elektrolýze 5-HMT při 0,9 V v roztoku o pH 3 (OP-H1, OP-H3), pH 7 (OP-H2, OP-H4, OP-H6A a OP-H6B) a pH 9 (OP-H5). Spektra byla získána za použití rampy kolizní energie 15–35 eV bez předešlé separace iontu (b, c) a s předešlou separací iontu (a, d, f – h). Spektrum (e) bylo získáno za použití rampy kolizní energie 5–15 eV s předešlou separací iontu.

### ***Produkty elektrolýzy 5-HMT s $m/z$ 356***

V roztocích 5-HMT elektrolyzovaných při potenciálu píku B byly nalezeny tři produkty se stejnou hmotností protonované molekuly  $[M + H]^+$   $m/z$  356, ale rozdílnými fragmentačními spektry (Obr. 15 d, e, f). Z elementárního složení všech tří izomerů s  $m/z$  356 (Tabulka 5) je zřejmé, že produkty budou mít na rozdíl od 5-HMT jeden atom kyslíku navíc a o dva atomy vodíku méně. Nejpolarnější z nich OP-H3, který je zároveň nejpolarnější ze všech produktů elektrolýzy 5-HMT, vycházel z kolony s retenčním časem  $t_R = 1,8$  min a vznikal elektrolýzou především v kyselém prostředí (pH 3,0; 900 mV). Stejně jako u produktu OP-H1, kde došlo k dehydrogenaci 5-hydroxymethylové skupiny na aldehydickou, je u produktu OP-H3 v  $MS^2$  spektru (Obr. 15 d)



pozorována ztráta CO, což naznačuje, že tento produkt by mohl také obsahovat aldehydickou skupinu. Byly pozorovány tři neutrální ztráty obsahující kyslík (kombinace ztrát CO a H<sub>2</sub>O), což naznačuje přítomnost aldehydické skupiny a dvou hydroxy skupin na benzenovém jádře. Ztráta H<sub>2</sub>O je snadná pro dvě hydroxyskupiny na benzenovém jádře navázané navzájem v *o*-poloze. V literatuře je ve fragmentačním spektru pyrokatecholu získaného různými ionizačními technikami (EI [132] nebo APCI [133]) vidět intenzivní ion po odštěpení vody z molekuly pyrokatecholu. Nejintenzivnější fragmentový ion spektra produktu OP-H3  $m/z$  209 odpovídá ztrátě CO, vody a diisopropylaminu. Během elektrolyzy 5-HMT tedy s velkou pravděpodobností dochází k hydroxylaci produktu OP-H1 do polohy 3 za vzniku produktu OP-H3, *Schéma 3*, str. 29).

Druhý izomer s  $m/z$  356, produkt OP-H4, vycházel z kolony v čase  $t_R = 2,1$  min a jeho největší množství bylo nalezeno v neutrálním roztoku 5-HMT elektrolyzovaném při potenciálu 900 mV. Při měření MS<sup>2</sup> spektra tohoto produktu s rampou vyšší kolizní energie 10–20 eV, 15–30 eV, nebo 15–35 eV byl ion prekurzoru zcela fragmentován a ve spektru tak nebyl znatelný. Po snížení energie na 5–15 eV byl ion prekurzoru  $[M + H]^+$   $m/z$  356 již pozorovatelný (Obr. 15 e). Nejintenzivnější pik spektra  $m/z$  227 odpovídal ztrátě diisopropylaminu a CO. Ve spektru byl také pozorovatelný pik s  $m/z$  296 odpovídající ztrátě CO a CH<sub>3</sub>OH. Na rozdíl od OP-H3 je u produktu OP-H4 pozorovatelná ztráta methanolu, což vede k domněnce, že 5-hydroxymethylová skupina zde zůstává nezměněna. Ve spektru byly nalezeny fragmentační ionty s  $m/z$  153 odpovídající hmotnosti molekuly 4-(hydroxymethyl)-3-methylcyklohex-3,5-dien-1,2-dionu a  $m/z$  139 korespondující s hmotností molekuly 4-(hydroxymethyl)cyklohex-3,5-dien-1,2-dionu. Struktura OP-H4 by tedy mohla obsahovat *o*-chinon (*Schéma 3*, str. 29).

Třetím, nejméně polárním izomerem  $m/z$  356 je produkt OP-H5 s retenčním časem  $t_R = 2,3$  min. Jako jediný z těchto tří izomerů vznikl i v zásaditém prostředí, kde bylo nalezeno jeho největší množství (pH 9,0; 900 mV). Stejně jako u OP-H4 je v MS<sup>2</sup> spektru (Obr. 15 f) pozorovatelná ztráta CH<sub>3</sub>OH, ale zároveň je vidět ztráta H<sub>2</sub>O a diisopropylaminu ( $\Delta$  119) jako u standardu 5-HMT (u OP-H4 tato ztráta není). Ve spektru je také pozorovatelný fragmentový ion s  $m/z$  123 odpovídající hmotnosti molekuly 4-hydroxybenzaldehydu a fragmentový ion s  $m/z$  105 korespondující s hmotností molekuly 4-methylcyklohex-2,5-dienonu. Uvedená fakta vedou k závěru, že oxidace u produktu OP-H5 by mohla být směřována na nesubstituované benzenové jádro do *p*-polohy (*Schéma 3*, str. 29).

#### ***Produkt elektrolyzy 5-HMT s $m/z$ 372***

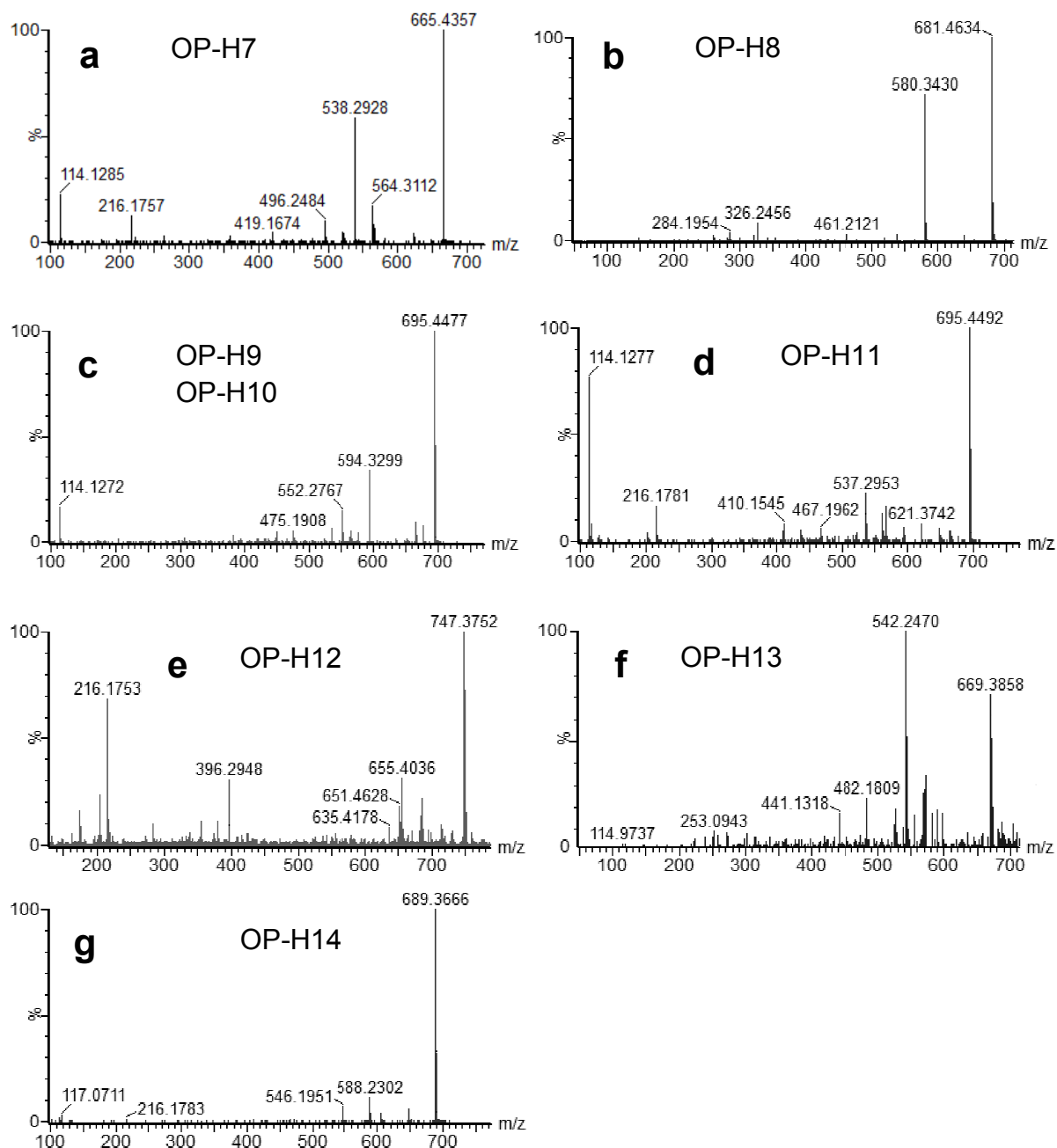
V roztocích 5-HMT elektrolyzovaných při potenciálu píku B byly nalezeny dva produkty OP-H6A a OP-H6B s protonovanou molekulou  $[M + H]^+$   $m/z$  372. Největší množství obou produktů bylo nalezeno v roztocích o neutrálním pH (900 mV). Produkt OP-H6A byl z kolony eluován v retenčním čase  $t_R = 2,1$  min a produkt OP-H6B v čase  $t_R = 2,6$  min (*Tabulka 5*).

Fragmentační spektra obou izomerů jsou odlišná (Obr. 15 g, h), některé fragmentové ionty však mají společné ovšem s různou intenzitou. V obou spektrech jsou pozorovatelné především ztráty vody, formaldehydu, diisopropylaminu a benzenu. V MS<sup>2</sup> spektru produktu OP-H6B jsou navíc zřejmé ztráty methoxylového radikálu. Methoxylace tohoto produktu OP-H6B by tedy mohla probíhat do polohy 5, která je již obsazená hydroxymethylem za vzniku odpovídajícího cyklohexadienonu (*Schéma 3*, str. 29). V literatuře je substituce do již obsazené pozice na benzenovém jádře popsána [134]. U produktu OP-H6A je ve spektru viditelná ztráta diisopropylaminu a vody ( $\Delta$  119) stejně jako u 5-HMT a OP-H5. Produkt OP-H6A by mohl vznikat methoxylací na substituované benzenové jádro 5-HMT s velkou pravděpodobností do polohy 3 (*Schéma 3*, str. 29).

#### ***Dimerní produkty elektrolyzy 5-HMT***

Elektrolyzou 5-HMT v kyselém prostředí při potenciálu 900 mV vzniká mnoho strukturně odlišných dimerů (OP-H7 – OP-H14) s rozdílnou retencí (*Tabulka 5*). V čase  $t_R = 2,8$  min byl nalezen produkt OP-H7 s protonovanou molekulou  $[M + H]^+$   $m/z$  665. Podle sumárního vzorce (*Tabulka 5*) by

mohlo jít o dimer vzniklý spojením 5-HMT a OP-H2 (chinon). Nejintenzivnější fragmentový ion spektra (Obr. 16 a) s  $m/z$  538 odpovídá ztrátě *N*-isopropyl-*N*-vinylpropan-2-aminu. Dimer OP-H7 by mohl vznikat vazbou C–C nejpravděpodobněji v polohách 3 (Schéma 3, str. 29).



Obr. 16. MS spektra dimerních oxidačních produktů 5-HMT: OP-H7 (a), OP-H8 (b), OP-H9 a OP-H10 (c), OP-H11 (d), OP-H12 (e), OP-H13 (f) a OP-H14 (g) změřené po elektrolýze 5-HMT při 0,9 V v roztoku o pH 3 (OP-H7, OP-H9, OP-H10, OP-H11 a OP-H14) a při 0,5 V v roztoku o pH 9 (OP-H8, OP-H12 a OP-H13). Spektra byla získána za použití rampy kolizní energie 15–35 eV bez předešlé separace iontu (b, e, f) a s předešlou separací iontu (a, c, d, g).

Další dimerní produkt OP-H8 poskytoval chromatografický pík v čase  $t_R = 2,9$  min s protonovanou molekulou  $[M + H]^+$   $m/z$  681. Podle sumárního vzorce (Tabulka 5) se jedná o dimer vzniklý spojením dvou molekul 5-HMT. Tento dimer byl jako jediný přítomen i v zásaditém prostředí, přičemž jeho největší množství obsahoval vzorek elektrolyzovaný v roztoku o pH 9,0 při potenciálu píku A (500 mV). Vyšší obsah produktu OP-H8 v alkalickém prostředí, oproti kyselému a neutrálnímu prostředí, je zřejmě důsledkem menší koncentrace monomerních produktů oxidace 5-HMT schopné tvořit dimery v alkalickém prostředí. Ve fragmentačním spektru (Obr. 16 b) je pozorovatelná ztráta

maximálně tři atomů kyslíku ve formě vody, CO nebo formaldehydu. Dimer by mohl vzniknout tvorbou vazby C–O, do které je zapojen pravděpodobně kyslík z hydroxyskupiny vázané přímo na benzenové jádro a uhlík v poloze 3 (*Schéma 3*, str. 29).

Další dimer OP-H9 byl zaznamenán v retenčním čase  $t_R = 2,6$  min s protonovanou molekulou  $[M + H]^+$   $m/z$  695. V čase  $t_R = 2,7$  min se eluoval dimer OP-H10 se stejnou hmotností, sumárním vzorcem i shodným fragmentačním spektrem (Obr. 16 c). V čase  $t_R = 3,3$  min byl eluován produkt OP-H11 také se stejným sumárním vzorcem, ale odlišným fragmentačním spektrem než předchozí dva dimery (Obr. 16 d). Všechny tyto tři izomerní dimery se podle sumárního vzorce a přesných hmot (*Tabulka 5*) skládají z jedné molekuly 5-HMT a jedné molekuly produktu OP-H3, OP-H4 nebo OP-H5. Naskýtá se zde několik možností navázání jednotlivých produktů na 5-HMT. Ke vzniku těchto dimerů může dojít přes uhlíky v různých polohách, přes vazbu C–O s mnoha kombinacemi propojení nebo v úvahu přichází vazba mezi dvěma kyslíky. Kvůli četnému množství možných kombinací lze tedy jen velmi obtížně odhadnout struktury těchto tří izomerů OP-H9 až OP-H11.

Dále byly zaznamenány dimery v retenčních časech  $t_R = 3,8$  min (OP-H12),  $t_R = 4,0$  min (OP-H13) a  $t_R = 4,2$  min (OP-H14). V MS spektrech můžeme najít jejich protonované molekuly  $[M + H]^+$   $m/z$  747 (OP-H12, Obr. 16 e),  $[M + H]^+$   $m/z$  669 (OP-H13, Obr. 16 f) a  $[M + H]^+$   $m/z$  689 (OP-H14, Obr. 16 g). Z MS spekter a sumárních vzorců (*Tabulka 5*) je jejich struktura jen obtížně odhadnutelná, protože nevznikají sloučením molekul již navrhovaných struktur.

Bližší popis jednotlivých struktur produktů elektrolyz by byl možný z NMR spekter, jejichž získání by však bylo v tomto případě velmi obtížné z důvodu nedostačujících výtěžků oxidačních produktů při elektrolyze pro NMR analýzu.

*Tabulka 18 UPLC/MS charakteristiky 5-HMT a jeho oxidačních produktů*

Látka	$t_R$ (min)	$[M + H]^+$ ( $m/z$ )	Sumární vzorec	Chyba (ppm)
5-HMT	2,0	342,2420	$C_{22}H_{32}NO_2$	-3,8
OP-H1	2,3	340,2233	$C_{22}H_{30}NO_2$	-12,9
OP-H2	2,4	326,2102	$C_{21}H_{28}NO_2$	-5,5
OP-H3	1,8	356,2146	$C_{22}H_{30}NO_3$	-14,9
OP-H4	2,1	356,2242	$C_{22}H_{30}NO_3$	4,5
OP-H5	2,3	356,2273	$C_{22}H_{30}NO_3$	13,2
OP-H6A	2,1	372,2514	$C_{23}H_{34}NO_3$	-6,7
OP-H6B	2,6	372,2593	$C_{23}H_{34}NO_3$	14,5
OP-H7 (dimer)	2,8	665,4357	$C_{43}H_{57}N_2O_4$	5,9
OP-H8 (dimer)	2,9	681,4634	$C_{44}H_{61}N_2O_4$	0,4
OP-H9 (dimer)	2,6	695,4477	$C_{44}H_{59}N_2O_5$	5,3
OP-H10 (dimer)	2,7	695,4435	$C_{44}H_{59}N_2O_5$	1,1
OP-H11 (dimer)	3,3	695,4492	$C_{44}H_{59}N_2O_5$	9,8
OP-H12 (dimer)	3,8	747,3752	$C_{45}H_{51}N_2O_8$	14,3
OP-H13 (dimer)	4,0	669,3858	$C_{41}H_{53}N_2O_6$	-6,9
OP-H14 (dimer)	4,2	689,3666	$C_{43}H_{49}N_2O_6$	10,9

$t_R$  – retenční čas, Chyba – relativní rozdíl mezi teoreticky vypočtenou hmotností iontu a experimentálně získanou

## 4. Mechanismus elektrochemické oxidace antimuskarinik

Z výsledků voltametrických experimentů a elektrolyzy za konstantního potenciálu s následnou analýzou oxidačních produktů pomocí UPLC/MS byl navržen mechanismus elektrochemické oxidace všech tří studovaných látek (TOL, FES a 5-HMT).

### 4.1. Mechanismus oxidace tolterodinu

Navržený mechanismus oxidace tolterodinu je znázorněn ve *Schématu 1*. V prvním reakčním kroku (pík A) dochází k jednoelektronové oxidaci, která může vést ke vzniku benzylového radikálu (1), který může být dále oxidován na benzylový kation [130] a hydrolyzován za vzniku 5-HMT

(OP-T1). Další možné tautomerní formy benzylového radikálu (**2**, **3**) mohou být oxidovány za vzniku produktů OP-T2 a OP-T3. Dále může probíhat konkurenční jednoelektronová oxidace za vzniku fenoxyl radikálu (**4**), který může dimerizovat [135] za tvorby produktů OP-T5 a OP-T6. Deprotonace hydroxyskupiny na aromatickém kruhu usnadňuje vznik fenoxyl radikálu a následně vznik dimerů, což koresponduje s nárůstem proudu píku A v alkalickém prostředí.

V dalším reakčním kroku je OP-T1 oxidován na odpovídající aldehyd (OP-T4). Tato reakce je dobře zaznamatelná v kyselém prostředí, protože v neutrálním a alkalickém prostředí přednostně dochází ke vzniku fenoxyl radikálů a následně dimerů. Oxidací dimerů mohou vznikat oligomery nebo chinoidní struktury (OP-T7). Z tohoto důvodu byl zaznamenán nárůst píku C. Adsorpce dimerů/oligomerů a chinoidních produktů prokázané ve voltametrických experimentech způsobují pokrytí elektrodového povrchu a znesnadňují elektrodové reakce.

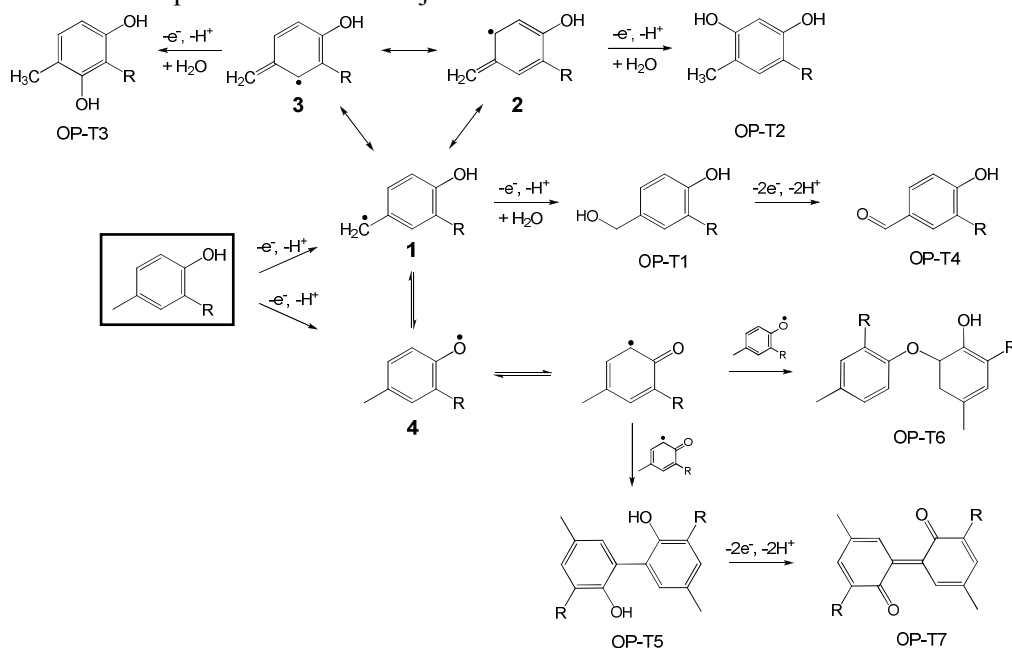


Schéma 11 Návrh mechanismu elektrochemické oxidace tolterodinu

#### 4.2. Mechanismus oxidace fesoterodinu

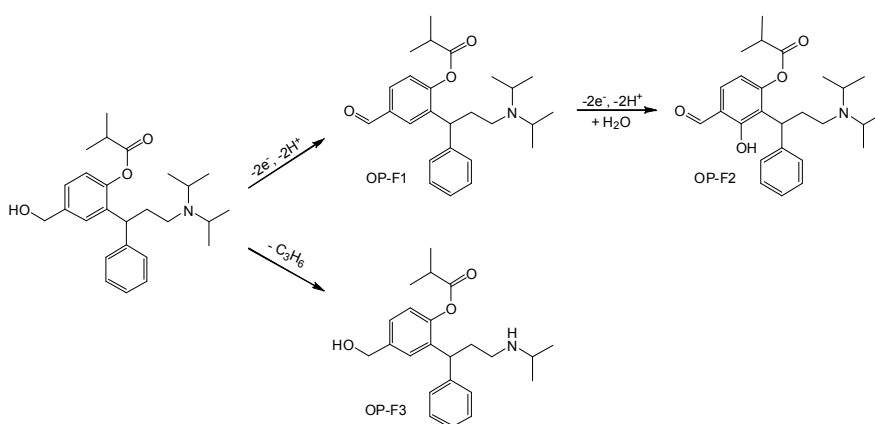


Schéma 12 Návrh mechanismu elektrochemické oxidace fesoterodinu

Navržený mechanismus oxidace fesoterodinu je znázorněn ve Schématu 2. Fesoterodin poskytoval ve voltametrickém záznamu jeden ireverzibilní oxidační signál, při kterém byl dehydrogenací přeměněn na jeho příslušný aldehyd (OP-F1). Tohoto produktu byl zaznamenán největší výtěžek a navíc s tímto tvrzením souhlasí i voltametrické experimenty (Odd. 1.2), kdy má docházet k jednoelektronové reverzibilní elektrodové reakci za vzniku radikálu následované

ireverzibilní chemickou reakcí. Této elektrochemické reakce se účastní stejný počet protonů a elektronů, jak ukazují  $E_p$  – pH závislosti. Oxidace substituovaných benzylalkoholů na příslušný benzaldehyd probíhá zřejmě ECEC mechanismem [136]. Produkt OP-F1 může dále podléhat hydroxylaci za vzniku produktu OP-F2. Samotný FES může během elektrolýzy podléhat oxidativní *N*-dealkylaci na produkt OP-F3.

#### 4.3. Mechanismus oxidace 5-hydroxymethyltolterodinu

Navržený mechanismus oxidace 5-HMT je znázorněn ve *Schématu 3*. V prvním reakčním kroku (pík A) dochází k jednoelektronové oxidaci, která vede ke vzniku fenoxyl radikálu, který reaguje za vzniku dimerů (OP-H7, OP-H8). Fenoxyl radikál může podléhat další oxidaci za vzniku fenoxoniového kationtu a ten může být hydroxylován za vzniku odpovídajícího hydrochinonu, který je následně oxidován na příslušný *p*-benzochinon (OP-H2), jak bylo popsáno pro strukturně podobnou sloučeninu [137]. Přes fenoxoniový kationt může docházet také ke vzniku *o*-chinonu OP-H4.

V prvním kroku oxidace zároveň dochází k dehydrogenaci 5-HMT za vzniku aldehydické skupiny (OP-H1). Mechanismus této reakce byl také objasněn a popsán u strukturně podobné sloučeniny [136,137]. OP-H1 může být dále oxidován přes fenoxyl radikál na fenoxoniový kationt, který dále podléhá hydroxylaci za vzniku OP-H3 vyskytujícího se ve dvou tautomerních formách. Hydroxylace může být směřována také na nesubstituované benzenové jádro 5-HMT vznikem produktu OP-H5, jehož redukováná forma vzniká metabolizací v těle krysa [138]. Oba aromatické kruhy se tak dostanou do vzájemné konjugace. Během elektrolýzy v prostředí 50 %  $\text{CH}_3\text{OH}$  může také dojít k methoxylaci (OP-H6A a OP-H6B). V případě dimerů by bylo možné navrhnout další struktury, přičemž jednoznačné rozhodnutí by vyžadovalo izolaci látek a jejich strukturní analýzu.

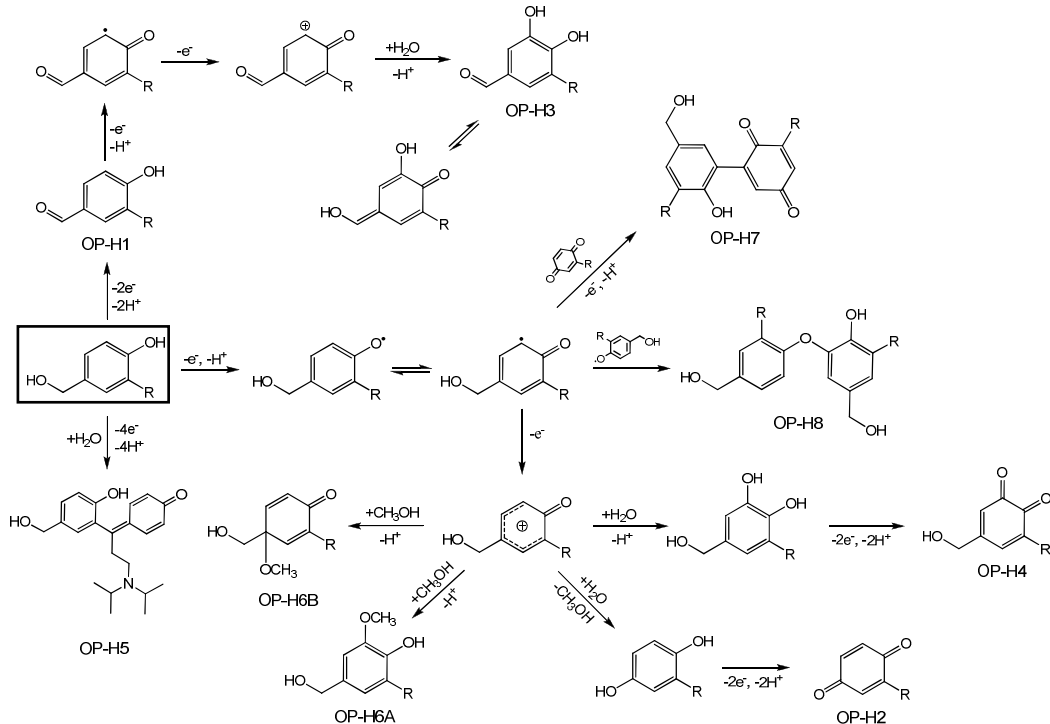


Schéma 13 Návrh mechanismu elektrochemické oxidace 5-hydroxymethyltolterodinu

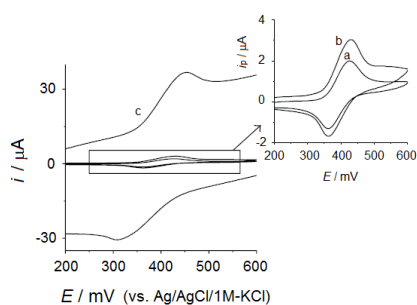
## 5. Elektrochemické chování rutinu na uhlíkových pastových elektrodách

V této kapitole je popsáno elektrochemické chování a stanovení flavonolu rutinu voltametrickými a amperometrickými technikami na třech různých uhlíkových pastových elektrodách: nemodifikované (CPE), modifikované ftalocyaninem železnatým (IP/CPE) a CPE s iontovou kapalinou [hmin][Tf<sub>2</sub>N] jako pojivem (IL/CPE). Cílem bylo zjistit, jak modifikace CPE ovlivňuje redoxní přeměnu rutinu a jsou-li studované elektrody použitelné pro stanovení rutinu v reálném vzorku.

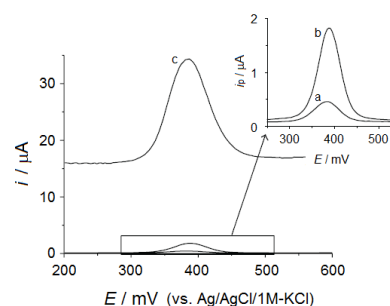
### 5.1 Voltametrické chování rutinu na uhlíkových pastových elektrodách

Oxidace rutinu se odehrává ve dvou po sobě jdoucích krocích. První redoxní přeměna je z pohledu analytické využitelnosti významnější, proto jsou nadcházející experimenty soustředěny na tento proces. První oxidační signál rutinu je kvazireverzibilní proces závislý na pH.

Závislost potenciálu píku rutinu na pH je tvořena dvěma lineárními úseky se směrnicemi  $-56 \text{ mV pH}^{-1}$  a  $-29 \text{ mV pH}^{-1}$ . Za předpokladu, že v prvním stupni oxidace rutinu se odštěpují dva elektrony, odpovídá vyšší hodnota směrnice zjištěná pro kyselé a neutrální prostředí ztrátě dvou protonů a nižší hodnota, zjištěná pro alkalické roztoky, ztrátě jednoho protonu. Průsečík obou přímkových úseků při pH 8,0 by mohl odpovídat zdánlivé disociační konstantě rutinu. Spektrofotometricky byla určena hodnota  $pK = 7,14$  [63], v literatuře je publikována hodnota  $pK = 7,1$  [139]. Proud píku rutinu je nejintenzivnější v kyselém prostředí ( $\text{pH} < 5$ ), s rostoucím pH klesá a při  $\text{pH} > 10$  už není pozorovatelný. Pro další experimenty bylo použito  $\text{pH} = 4$ , při němž rutin poskytuje nejvyšší odezvu [63,140].



Obr. 17. Cyklické voltamogramy rutinu na IP/CPE (a), CPE (b) a IL/CPE (c) naměřené v roztoku rutinu o koncentraci 0,1 mmol/l v octanovém pufru  $\text{pH} = 4,0$  při rychlosti scanu 0,1 V/s.



Obr. 18. Diferenční pulzní voltamogramy rutinu na IP/CPE (a), CPE (b) a IL/CPE (c) naměřené v roztoku rutinu o koncentraci 8  $\mu\text{mol/l}$  v octanovém pufru  $\text{pH} = 4,0$  při rychlosti scanu 0,02 V/s, s pulzní amplitudou 0,05 V a šířkou pulzu 0,1 s.

Průvodní experimenty pro srovnání třech připravených CPEs zahrnovaly srovnání jejich použitelného potenciálového rozsahu a proudového pozadí. Nejširší použitelný potenciálový rozsah měla elektroda IL/CPE (2,5 V), ve srovnání s CPE (1,5 V) a IP/CPE (1,3 V), a zároveň vykazovala i nejvyšší proudové pozadí (asi 60x vyšší než CPE a IP/CPE). Vysoké proudové pozadí je typické pro elektrody s iontovou kapalinou jako pojivem [141].

Všechny tři studované elektrody dávaly cyklické voltamogramy rutinu s kvazireverzibilní dvojicí píků (Obr. 17), jejichž parametry jsou uvedeny v *Tabulce 6*. Nejvyšší poměr proudu katodického a anodického píku, který značí lepší reverzibilitu redoxní reakce rutinu, měla mezi testovanými elektrodami IP/CPE. Z toho vyplývá, že ftalocyanin železnatý katalyzuje oxidaci rutinu podobně jako u jiných fenolů a polyfenolů [142,143]. Proud píku rutinu byl téměř desetkrát vyšší u IL/CPE než u CPE. Nicméně větší rozdíl potenciálů katodického a anodického píku  $\Delta E_p$  u IL/CPE (dvojnásobný oproti CPE) a srovnatelný poměr  $i_c/i_a$  (*Tabulka 6*) značí, že vyšší proud píku není způsoben elektrokatalytickým efektem iontové kapaliny, ale spíše větší elektroaktivní plochou elektrody. Toto tvrzení podporuje také vysoké proudové pozadí IL/CPE ve srovnání s CPE. Stejně

jako u CV, také diferenční pulzní voltametrií byla zaznamenána nejvyšší proudová odezva rutinu na elektrodě IL/CPE (Obr. 18).

Byla pozorována silná adsorpce rutinu na všech třech studovaných elektrodách. Nejdříve byla studována samovolná adsorpce rutinu tak, že elektrody byly ponořeny na 5 min do roztoku rutinu o koncentraci 2  $\mu\text{mol/l}$ , poté byly vyjmuty z roztoku, opláchnuty destilovanou vodou a vloženy do elektrochemické cely se základním elektrolytem. Signál rutinu byl pozorován u všech tří elektrod. Výška píku, ve srovnání s výškou píku zaznamenaného v roztoku rutinu o koncentraci 2  $\mu\text{mol/l}$ , odpovídala 77 % pro CPE, 64 % pro IL/CPE a 50 % pro IP/CPE. Po obnovení povrchu elektrod už nebyla v základním elektrolytu pozorována žádná odezva, což vylučuje kontaminaci základního elektrolytu a také difúzi roztoku rutinu do hloubky elektrodového materiálu.

Dále byla sledována závislost odezvy rutinu na potenciálu a čase akumulace pomocí DPAdSV. Akumulace v roztoku rutinu o koncentraci 2  $\mu\text{mol/l}$  byla nejúčinnější při potenciálu akumulace +0,1 V a čase akumulace 25 s. Pro všechny tři elektrody byly zjištěny podobné závislosti. Z experimentů vyplývá, že rutin se velmi dobře adsorbuje na povrchu uhlíkových pastových elektrod a jeho adsorpce je podpořena vloženým potenciálem. Silná adsorpce rutinu tak může být využita pro zvýšení citlivosti stanovení rutinu pomocí jeho akumulace na elektrodový povrch.

*Tabulka 19 Parametry CV píku rutinu ( $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ ) na třech studovaných uhlíkových pastových elektrodách.*

Elektroda	$E_{pa}$ (mV)	$E_{pc}$ (mV)	$\Delta E_p$ (mV)	$i_a \pm s_a$ ( $\mu\text{A}$ )	$i_c/i_a$
CPE	429	363	66	$2,2 \pm 0,02$	0,65
IP/CPE	427	367	60	$1,6 \pm 0,02$	0,76
IL/CPE	450	318	132	$21,5 \pm 0,32$	0,66

$E_{pa}$  – potenciál anodického píku,  $E_{pc}$  – potenciál katodického píku (vs. Ag/AgCl, 1M-KCl),  $\Delta E_p$  – rozdíl potenciálů anodického a katodického píku,  $i_a$  – proud anodického píku (průměr ze sedmi opakovaných měření se směrodatnou odchylkou –  $s_a$ ),  $i_c/i_a$  – podíl katodického a anodického proudu píku.

## 5.2 Voltametrické stanovení rutinu na uhlíkových pastových elektrodách

Kalibrační závislosti rutinu byly měřeny metodami DPV a DPAdSV se všemi třemi studovanými elektrodami. Obě metody poskytovaly lineární kalibrační závislosti pro oblast mikromolárních koncentrací. U DPAdSV bylo dosaženo nižších mezí detekce, ale také užšího lineárního koncentračního rozsahu. Akumulace měla největší vliv na zvýšení signálu rutinu u elektrody IL/CPE, kde bylo dosaženo meze detekce 5  $\text{nmol/l}$  (Tabulka 7).

Voltametrické stanovení rutinu bylo testováno na reálném vzorku semen pohanky seté (*Fagopyrum esculentum moench.*). Pro extrakci rutinu byly použity čtyři extrakční postupy: extrakce varem (BWE), Soxhletova extrakce (SE), vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (PSE) a superkritická fluidní extrakce (SFE). Cílem bylo nalézt nejvhodnější metodu pro izolaci rutinu z pohankových semen. Pro voltametrické stanovení byla použita DPV bez akumulace. Extrakty získané metodou SFE neposkytly žádný elektrochemický signál rutinu. Použité rozpouštědlo, oxid uhličitý, je zřejmě nevhodný pro extrakci tohoto polárního analytu. Ve vzorcích PSE extraktů byla zaznamenána odezva při 0,1 V, což je nižší potenciál než poskytuje rutin. Tento signál odpovídá nejpravděpodobněji oxidaci kvercetinu, jak bylo dokázáno přidávkem standardního roztoku kvercetinu do měřeného vzorku PSE extraktu. Přítomnost kvercetinu místo rutinu může být vysvětlena buď hydrolyzou rutinu na jeho aglykon, kvercetin, nebo, což je více pravděpodobné, přednostní extrakcí méně polárního kvercetinu do méně polárního rozpouštědla (acetonu). V extraktu získaného metodou SE byl rutin detegován, ale jeho signál se překrýval se signálem kvercetinu, což znemožnilo rutin v tomto extraktu stanovit. V extraktu získaného metodou BWE byl detegován pouze rutin, neboť méně polární kvercetin je ve vodě hůře rozpustný. V tomto extraktu mohl být rutin stanoven.

Obsahu rutinu v BWE extraktu metodou standardního přídatku jsou ( $11,8 \pm 0,8$ )  $\text{mg/100 g}$  pro CPE, ( $13,3 \pm 2,1$ )  $\text{mg/100 g}$  pro IP/CPE a ( $11,0 \pm 0,6$ )  $\text{mg/100 g}$  pro IL/CPE. Referenční metodou

HPLC/UV-Vis byl stanoven srovnatelný obsah rutinu v extraktu získaného metodou BWE ( $11,4 \pm 0,1$ ) mg/100 g. Tyto výsledky korespondují s obsahem rutinu v pohankových semenech uvedenými v literatuře ( $13,6$  mg/100 g) [144]. Všechny tři elektrody jsou tedy použitelné pro stanovení rutinu v modelovém vzorku i reálném vzorku pohanky, kde však velmi záleží na volbě extrakčního postupu a zejména rozpouštědla.

Tabulka 20 Parametry regresních kalibračních přímek rutinu, meze detekce a stanovitelnosti na studovaných uhlíkových pastových elektrodách metodou DPV a DPAdSV

Metoda	Elektroda	LOD ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	$a \pm s_a$ ( $\text{nA l } \mu\text{mol}^{-1}$ )	$b \pm s_b$ (nA)	$R^2$	c ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )
DPV	CPE	0,2	0,7	$2 \cdot 10^9 \pm 8 \cdot 10^7$	$-41,9 \pm 28,9$	0,9911	0,2 – 8
	IP/CPE	0,08	0,3	$8 \cdot 10^7 \pm 2 \cdot 10^6$	$19,4 \pm 6,0$	0,9985	0,08 – 6
	IL/CPE	0,6	2,0	$8 \cdot 10^7 \pm 4 \cdot 10^6$	$21,1 \pm 12,4$	0,9920	0,6 – 6
DPAdSV	CPE	0,01	0,03	$5 \cdot 10^8 \pm 3 \cdot 10^7$ $9 \cdot 10^8 \pm 6 \cdot 10^7$	$-2,15 \pm 2,05$ $-171 \pm 38$	0,9784 0,9886	0,01 – 0,1 0,2 – 1
	IP/CPE	0,02	0,06	$8 \cdot 10^8 \pm 3 \cdot 10^7$	$-13,5 \pm 7,3$	0,9935	0,02 – 0,6
	IL/CPE	0,005	0,02	$5 \cdot 10^9 \pm 2 \cdot 10^8$	$172 \pm 68$	0,9852	0,005 – 0,8

LOD – odhad meze detekce, LOQ – odhad meze stanovitelnosti,  $a$  – směrnice kalibrační závislosti,  $b$  – úsek kalibrační přímky,  $R^2$  – koeficient determinace,  $s$  – směrodatná odchylka, c – lineární koncentrační rozsah

### 5.3 Amperometrické stanovení rutinu na uhlíkových pastových elektrodách

Kromě voltametrických technik byla pro stanovení rutinu na uhlíkových pastových elektrodách zvolena také amperometrie. Amperometrické měření rutinu bylo prováděno v míchaném roztoku v tříelektrodovém elektrochemickém článku s pracovními uhlíkovými pastovými elektrodami, použitými k výše popsaným voltametrickým experimentům. Po opakovaných nástřících standardního roztoku rutinu docházelo u všech tří testovaných elektrod ke zvyšování šumu, což mohlo být způsobeno adsorpcí rutinu nebo jeho oxidačních produktů na povrch elektrody. U elektrody modifikované iontovou kapalinou byl šum pozorován už při nízkých koncentracích rutinu ( $5 \mu\text{mol/l}$ ), což znesnadňovalo vyhodnocování amperogramu.

Byla snaha vyvinout metodu, která by potlačila nežádoucí šum. Použitím pulzní techniky zahrnující čistící krok při  $-300$  mV po dobu 30 s došlo k významnému zlepšení poměru signál/šum. U pulzní techniky bylo také dosaženo nižších hodnot mezí detekce a stanovitelnosti. Nejnižší hodnoty LOD a LOQ byly zjištěny u nemodifikované CPE. Zvyšování koncentrace mělo za následek nelinearitu kalibrační závislosti v důsledku adsorpce rutinu nebo jeho produktů na povrch elektrody. U nemodifikované CPE byl zároveň zaznamenán nejširší lineární koncentrační rozsah rutinu za použití pulzní amperometrické techniky (Tabulka 8).

Tabulka 21 Parametry regresních kalibračních přímek rutinu na uhlíkových pastových elektrodách získané z amperometrických měření

Metoda	Elektroda	LOD ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	$a \pm s_a$ ( $\text{nA l mmol}^{-1}$ )	$b \pm s_b$ (nA)	$R^2$	c ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )
Amperometrie	CPE	1,31	1,94	$63,1 \pm 0,8$	$-0,16 \pm 0,01$	0,9987	5,0 – 27,5
	IP/CPE	1,60	2,33	$41,9 \pm 0,9$	$0,04 \pm 0,01$	0,9985	2,5 – 22,5
	IL/CPE	8,77	12,95	$4,4 \pm 0,1$	$-0,04 \pm 0,01$	0,9991	25,0 – 200
Pulzní amperometrie	CPE	0,20	0,29	$24,6 \pm 0,4$	$0,01 \pm 0,01$	0,9967	0,25 – 3,15
	IP/CPE	0,50	0,75	$45,0 \pm 0,3$	$-0,02 \pm 0,01$	0,9997	2,5 – 24,3
	IL/CPE	3,05	4,20	$96,4 \pm 5,1$	$0,20 \pm 0,04$	0,9891	2,5 – 12,3

LOD – odhad meze detekce, LOQ – odhad meze stanovitelnosti,  $a$  – směrnice kalibrační závislosti,  $b$  – úsek kalibrační přímky,  $R^2$  – koeficient determinace,  $s$  – směrodatná odchylka, c – lineární koncentrační rozsah



## Závěr

Elektrochemické chování dvou antimuskarinových léčiv, tolterodinu a fesoterodinu, a jejich společného aktivního metabolitu 5-hydroxymethyltolterodinu bylo sledováno třemi různými elektrochemickými technikami (CV, DPV, SWV). Nejdříve byla provedena voltametrická měření, dále byly látky separovány za použití HPLC s elektrochemickou detekcí s borem dopovanou diamantovou elektrodou a všechny tři látky byly také elektrolyzovány v různých prostředích s použitím coulometrie za konstantního potenciálu s následnou UPLC/ESI-MS analýzou oxidačních produktů. Také bylo studováno elektrochemické chování rutinu voltametrickými a amperometrickými technikami na uhlíkových pastových elektrodách.

Elektrochemické chování studovaných látek je silně závislé na pH. Z voltametrických analýz byly zjištěny dva ireverzibilní oxidační stupně tolterodinu, přičemž při  $\text{pH} \geq 6$  se objevoval třetí anodický signál. FES poskytoval pouze jeden ireverzibilní oxidační pík. V alkalickém prostředí však docházelo k samovolné hydrolýze FES na 5-HMT. V záznamu cyklické voltametrie 5-HMT byly v anodické části patrné dva oxidační signály a v katodické oblasti jim odpovídající dva redukční píky.

Byla vyvinuta metoda chromatografické separace TOL, FES a 5-HMT technikou HPLC s elektrochemickou detekcí. Jako elektrochemické čidlo byla zvolena borem dopovaná diamantová elektroda. Pro izokratický mód se jako mobilní fáze nejlépe osvědčila směs acetonitril/fosfátový pufr pH 7 o koncentraci 0,05 mol/l v poměru 30:70 (v/v). Ze čtyř testovaných kolon bylo nejpriznivějších výsledků dosaženo na koloně Nucleodur® CN-RP 3  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  2 mm I. D., protože nejlépe potlačila rozdíly v polaritě studovaných látek při zachování požadovaného rozlišení analytů. Odhady mezi detekce se pohybovaly v jednotkách nmol/l. Tato metoda se může stát součástí postupu vhodného ke stanovení studovaných látek v moči nebo plazmě.

Za použití coulometrie za konstantního potenciálu byly TOL, FES a 5-HMT elektrochemicky oxidovány a produkty elektrolyzy byly následně analyzovány metodou UPLC/ESI-MS. Elektrolyza TOL vedla především ke vzniku hydroxyderivátů a dimerů. FES byl elektrolyzován za vzniku příslušného aldehydu. Elektrolyzou 5-HMT vznikalo největší množství produktů, což je v souladu s jeho složitějším voltametrickým chováním. Jednalo se o produkty vzniklé dehydrogenací, hydroxylací, methoxylací nebo dimerizací. Mezi produkty elektrochemické oxidace studovaných antimuskarinik byly nalezeny i látky vznikající metabolickou cestou v živých organismech. Elektrolyzou tolterodinu vznikl produkt OP-T1, jehož struktura odpovídá 5-HMT, hlavnímu metabolitu TOL v lidském těle i v tělech pokusných zvířat [142,145]. Elektrolyzou 5-HMT byl získán produkt OP-H5, jehož redukovaná forma vzniká metabolizací v těle krysy [142].

Bylo studováno elektrochemické chování rutinu na třech CPEs: nemodifikované (CPE), modifikované ftalocyaninem železnatým (IP/CPE) a s iontovou kapalinou [hmin][Tf<sub>2</sub>N] jako pojivem (IL/CPE). Bylo zjištěno, že modifikátor ftalocyanin železnatý má elektrokatalytický účinek na oxidaci rutinu. Iontová kapalina zvyšovala proudovou odezvu rutinu se současným zvýšením proudového pozadí, což je zřejmě způsobeno zvětšením elektroaktivní plochy elektrody. Rutin je silně adsorbován na povrch všech studovaných pracovních elektrod, což bylo využito ke zvýšení citlivosti použitím metody DPAdSV. S touto technikou tak bylo na IL/CPE dosaženo meze detekce 5 nmol/l. CPEs při amperometrických měřeních za konstantního potenciálu vykazovaly velký šum. Pro jeho potlačení byla navržena pulzní amperometrická metoda zahrnující čisticí krok při -300 mV po dobu 30 s, se kterou bylo navíc dosaženo nižších LOD. Všechny testované CPEs jsou použitelné pro analýzu rutinu v reálných vzorcích, jak bylo prokázáno na analýze extraktů ze semen pohanky seté.

# Literatura

212. McCreedy T., Fielden P. R.: *Amperometric Detector for High-Performance Liquid-Chromatography, Featuring a Glassy-Carbon Working Electrode Array in the Wall-Jet Configuration*. *Analyst* 120, 2343-2346 (1995).
213. Mattusch J., Welsch T., Werner G.: *Hplc-Electrochemical Detector with a Carbon-Fiber Working Electrode*. *J Prak Chem-Chem Ztg* 334, 49-52 (1992).
214. Dong Q., Dong R., Jin M. L., Jin W. R.: *Direct amperometric determination of lactate at a carbon fiber bundle microdisk electrode by capillary zone electrophoresis*. *J Chromatogr B* 774, 121-126 (2002).
215. Nemcova L., Zima J., Barek J., Janovska D.: *Determination of resveratrol in grains, hulls and leaves of common and tartary buckwheat by HPLC with electrochemical detection at carbon paste electrode*. *Food Chem* 126, 374-378 (2011).
216. Chicharro M., Bermejo E., Ongay S., Zapardiel A.: *Determination of maleic hydrazide in potato samples using capillary electrophoresis with dual detection (UV-electrochemical)*. *Electroanal* 20, 534-541 (2008).
217. Jirovsky D., Horakova D., Kotoucek M., Valentova K., Ulrichova J.: *Analysis of phenolic acids in plant materials using HPLC with amperometric detection at a platinum tubular electrode*. *J Sep Sci* 26, 739-742 (2003).
218. Kreuzig F., Frank J.: *Rapid Automated-Determination of Deuterium-Penicillamine in Plasma and Urine by Ion-Exchange High-Performance Liquid-Chromatography with Electrochemical Detection Using a Gold Electrode*. *J Chromatogr* 218, 615-620 (1981).
219. Trojanowicz M., Martin G. B., Meyerhoff M. E.: *Reversed-phase HPLC of peptides with tetraphenylporphyrin-based stationary phase and potentiometric detection with a copper electrode*. *Chem Anal-Warsaw* 41, 521-530 (1996).
220. Schlager J. W., Baldwin R. P.: *Liquid-Chromatography Electrochemical Detection of Ferrocytochrome-C and Ferricytochrome-C at a Chemically Modified Gold Electrode*. *J Chromatogr* 390, 379-389 (1987).
221. Ivandini T. A., Sarada B. V., Terashima C., Rao T. N., Tryk D. A., Ishiguro H., Kubota Y., Fujishima A.: *Electrochemical detection of tricyclic antidepressant drugs by HPLC using highly boron-doped diamond electrodes*. *J Electroanal Chem* 521, 117-126 (2002).
222. Chailapakul O., Siangproh W., Sarada B. V., Terashima C., Rao T. N., Tryk D. A., Fujishima A.: *The electrochemical oxidation of homocysteine at boron-doped diamond electrodes with application to HPLC amperometric detection*. *Analyst* 127, 1164-1168 (2002).
223. Terashima C., Rao T. N., Sarada B. V., Tryk D. A., Fujishima A.: *Electrochemical oxidation of chlorophenols at a boron-doped diamond electrode and their determination by high-performance liquid chromatography with amperometric detection*. *Anal Chem* 74, 895-902 (2002).
224. Wang J., Chen G., Chatrathi M. P., Fujishima A., Tryk D. A., Shin D.: *Microchip capillary electrophoresis coupled with a boron-doped diamond electrode-based electrochemical detector*. *Anal Chem* 75, 935-939 (2003).
225. Shin D. C., Tryk D. A., Fujishima A., Muck A., Chen G., Wang J.: *Microchip capillary electrophoresis with a boron-doped diamond electrochemical detector for analysis of aromatic amines*. *Electrophoresis* 25, 3017-3023 (2004).
226. Wang J., Chen G., Muck A., Shin D. C., Fujishima A.: *Microchip capillary electrophoresis with a boron-doped diamond electrode for rapid separation and detection of purines*. *J Chromatogr A* 1022, 207-212 (2004).
227. Bartosova Z., Jirovsky D., Horna A.: *High-performance liquid chromatographic method with amperometric detection employing boron-doped diamond electrode for the determination of sildenafil, vardenafil and their main metabolites in plasma*. *J Chromatogr A* 1218, 7996-8001 (2011).
228. Bartosova Z., Riman D., Jakubec P., Halouzka V., Hrbac J., Jirovsky D.: *Electrochemically Pretreated Carbon Microfiber Electrodes as Sensitive HPLC-EC Detectors*. *Sci World J*, (2012).
229. Hambitzer G., Heitbaum J.: *Electrochemical Thermospray Mass-Spectrometry*. *Anal Chem* 58, 1067-1070 (1986).
230. Phillips L. R., Bartmess J. E.: *Electrochemically Assisted Fast Atom Bombardment Negative-Ion Mass-Spectrometry of Quinones*. *Biomed Environ Mass* 18, 878-883 (1989).
231. Diehl G., Liesener A., Karst U.: *Liquid chromatography with post-column electrochemical treatment and mass spectrometric detection of non-polar compounds*. *Analyst* 126, 288-290 (2001).
232. Zhang T. Y., Brajter-Toth A.: *On-line investigation of the generation of nonaqueous intermediate radical cations by electrochemistry/mass spectrometry*. *Anal Chem* 72, 2533-2540 (2000).
233. Zhou F. M.: *Electrochemistry combined on-line with atomic mass spectrometry and related techniques for trace-metal analysis and electrode-reaction studies*. *Trac-Trend Anal Chem* 24, 218-227 (2005).
234. Zhou F. M., Vanberkel G. J.: *Electrochemistry Combined Online with Electrospray Mass-Spectrometry*. *Anal Chem* 67, 3643-3649 (1995).
235. Chen L., Hofmann D., Klumpp E., Xiang X. Y., Chen Y. X., Koppers S.: *Bottom-up approach for the reaction of xenobiotics and their metabolites with model substances for natural organic matter by electrochemistry-mass spectrometry (EC-MS)*. *Chemosphere* 89, 1376-1383 (2012).
236. Skopalova J., Vacek J., Papouskova B., Jirovsky D., Maier V., Ranc V.: *Electrochemical oxidation of berberine and mass spectrometric identification of its oxidation products*. *Bioelectrochemistry* 87, 15-20 (2012).
237. Jahn S., Seiwert B., Kretzing S., Abraham G., Regenthal R., Karst U.: *Metabolic studies of the Amaryllidaceous alkaloids galantamine and lycorine based on electrochemical simulation in addition to in vivo and in vitro models*. *Anal Chim Acta* 756, 60-72 (2012).
238. Lohmann W., Karst U.: *Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism*. *Anal Bioanal Chem* 391, 79-96 (2008).
239. Permentier H. P., Bruins A. P.: *Electrochemical oxidation and cleavage of proteins with on-line mass spectrometric detection: Development of an instrumental alternative to enzymatic protein digestion*. *J Am Soc Mass Spectr* 15, 1707-1716 (2004).
240. Permentier H. P., Jurva U., Barroso B., Bruins A. P.: *Electrochemical oxidation and cleavage of peptides analyzed with on-line mass spectrometric detection*. *Rapid Commun Mass Sp* 17, 1585-1592 (2003).
241. Baumann A., Lohmann W., Jahn S., Karst U.: *On-Line Electrochemistry/Electrospray Ionization Mass Spectrometry (EC/ESI-MS) for the Generation and Identification of Nucleotide Oxidation Products*. *Electroanal* 22, 286-292 (2010).
242. Chen H., Zhang Y. H., Mutlib A. E., Zhong M.: *Application of on-line electrochemical derivatization coupled with high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry for detection and quantitation of (p-chlorophenyl)aniline in biological samples*. *Anal Chem* 78, 2413-2421 (2006).
243. Pretty J. R., Van Berkel G. J.: *Electrochemical sample pretreatment coupled on-line with electrospray mass spectrometry for enhanced elemental analysis*. *Rapid Commun Mass Sp* 12, 1644-1652 (1998).
244. Li J. W., Dewald H. D., Chen H.: *Online Coupling of Electrochemical Reactions with Liquid Sample Desorption Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*. *Anal Chem* 81, 9716-9722 (2009).
245. Liu P. Y., Lanekoff I. T., Laskin J., Dewald H. D., Chen H.: *Study of Electrochemical Reactions Using Nanospray Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. *Anal Chem* 84, 5737-5743 (2012).
246. Faber H., Melles D., Brauckmann C., Wehe C. A., Wentker K., Karst U.: *Simulation of the oxidative metabolism of*

- diclofenac by electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem 403, 345-354 (2012).
247. Jahn S., Baumann A., Roscher J., Hense K., Zazzeroni R., Karst U.: *Investigation of the biotransformation pathway of verapamil using electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry - A comparative study with liver cell microsomes*. J Chromatogr A 1218, 9210-9220 (2011).
  248. Baumann A., Lohmann W., Schubert B., Oberacher H., Karst U.: *Metabolic studies of tetrazepam based on electrochemical simulation in comparison to in vivo and in vitro methods*. J Chromatogr A 1216, 3192-3198 (2009).
  249. Lohmann W., Karst U.: *Electrochemistry meets enzymes: instrumental on-line simulation of oxidative and conjugative metabolism reactions of toremifene*. Anal Bioanal Chem 394, 1341-1348 (2009).
  250. Blankert B., Hayen H., van Leeuwen S. M., Karst U., Bodoki E., Lotrean S., Sandulescu R., Diez N. M., Dominguez O., Arcos J., Kauffmann J. M.: *Electrochemical, chemical and enzymatic oxidations of phenothiazines*. Electroanal 17, 1501-1510 (2005).
  251. Bussy U., Ferchaud-Roucher V., Tea I., Krempf M., Silvestre V., Boujtita M.: *Electrochemical oxidation behavior of Acebutolol and identification of intermediate species by liquid chromatography and mass spectrometry*. Electrochim Acta 69, 351-357 (2012).
  252. Nozaki K., Kitagawa H., Kimura S., Kagayama A., Arakawa R.: *Investigation of the electrochemical oxidation products of zotepine and their fragmentation using on-line electrochemistry/electrospray ionization mass spectrometry*. J Mass Spectrom 41, 606-612 (2006).
  253. Jirovsky D., Bednar P., Myjavcova R., Bartosova Z., Skopalova J., Tvrdonova M., Lemr K.: *Study of electrochemical oxidation of cyanidin glycosides by online combination of electrochemistry with electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Monatsh Chem 142, 1211-1217 (2011).
  254. Odijk M., Baumann A., Lohmann W., van den Brink F. T. G., Olthuis W., Karst U., van den Berg A.: *A microfluidic chip for electrochemical conversions in drug metabolism studies*. Lab Chip 9, 1687-1693 (2009).
  255. Odijk M., Baumann A., Olthuis W., van den Berg A., Karst U.: *Electrochemistry-on-chip for on-line conversions in drug metabolism studies*. Biosens Bioelectron 26, 1521-1527 (2010).
  256. Svancara I., Vytras K.: *Preparation and Properties of Carbon-Paste Electrodes*. Chem Listy 88, 138-146 (1994).
  257. Kalcher K.: *Chemically Modified Carbon Paste Electrodes in Voltammetric Analysis*. Electroanal 2, 419-433 (1990).
  258. Švancara I., Kalcher K., Vytras K.: *Fifty years of carbon paste electrodes in fact, numbers and notes: Non-Traditional Reminiscence of an Jubilee in Electrochemistry and Electroanalysis*, str. 7. In: *Sensing in Electroanalysis*, Vol. 3, (Vytras K., Kalcher K., Švancara I., eds.), University of Pardubice, Pardubice 2008.
  259. Baker R., Wilkinson D. P., Zhang J. J.: *Electrocatalytic activity and stability of substituted iron phthalocyanines towards oxygen reduction evaluated at different temperatures*. Electrochim Acta 53, 6906-6919 (2008).
  260. Qi X. H., Baldwin R. P.: *Liquid-Chromatography and Electrochemical Detection of Organic Peroxides by Reduction at an Iron Phthalocyanine Chemically-Modified Electrode*. Electroanal 5, 547-554 (1993).
  261. Yu C. S., Choi H., Kim S.: *Electrocatalytic reduction of sulfur dioxide by iron phthalocyanine monolayer in acidic conditions*. Chem Lett, 648-649 (2002).
  262. Choi H. J., Kwag G., Kim S.: *Electrochemical and XAFS investigation of nitrite reduction by heat-treated mu-oxo derivative of iron phthalocyanine supported on high area carbon*. J Electroanal Chem 508, 105-114 (2001).
  263. Grodkowski J., Dhanasekaran T., Neta P., Hambright P., Brunschwig B. S., Shinozaki K., Fujita E.: *Reduction of cobalt and iron phthalocyanines and the role of the reduced species in catalyzed photoreduction of CO<sub>2</sub>*. J Phys Chem A 104, 11332-11339 (2000).
  264. Zagal J. H.: *Metallophthalocyanines as Catalysts in Electrochemical Reactions*. Coordin Chem Rev 119, 89-136 (1992).
  265. Oni J., Nyokong T.: *Simultaneous voltammetric determination of dopamine and serotonin on carbon paste electrodes modified with iron(II) phthalocyanine complexes*. Anal Chim Acta 434, 9-21 (2001).
  266. Shahrokhian S., Ghalkhani M., Amini M. K.: *Application of carbon-paste electrode modified with iron phthalocyanine for voltammetric determination of epinephrine in the presence of ascorbic acid and uric acid*. Sensor Actuat B-Chem 137, 669-675 (2009).
  267. Amini M. K., Shahrokhian S., Tangestaninejad S., Mirkhani V.: *Iron(II) phthalocyanine-modified carbon-paste electrode for potentiometric detection of ascorbic acid*. Anal Biochem 290, 277-282 (2001).
  268. Shahrokhian S., Ghalkhani M., Amini M. K.: *Application of carbon-paste electrode modified with iron phthalocyanine for voltammetric determination of epinephrine in the presence of ascorbic acid and uric acid*. Sensor Actuat B-Chem 137, 669-675 (2009).
  269. Siswana M., Ozoemena K. I., Nyokong T.: *Electrocatalytic behaviour of carbon paste electrode modified with iron(II) phthalocyanine (FePc) nanoparticles towards the detection of amitrole*. Talanta 69, 1136-1142 (2006).
  270. Zhang Y., Zheng J. B.: *Comparative investigation on electrochemical behavior of hydroquinone at carbon ionic liquid electrode, ionic liquid modified carbon paste electrode and carbon paste electrode*. Electrochim Acta 52, 7210-7216 (2007).
  271. Sun W., Yang M. X., Jiao K.: *Electrocatalytic oxidation of dopamine at an ionic liquid modified carbon paste electrode and its analytical application*. Anal Bioanal Chem 389, 1283-1291 (2007).
  272. Ojani R., Raouf J. B., Zamani S.: *A New and Simple Electrocatalyst for Formaldehyde Oxidation; Nickel/poly(o-Anisidine)/Film Modified Ionic Liquid Carbon Paste Electrode*. J Chin Chem Soc-Taip 60, 488-494 (2013).
  273. Franzoi A. C., Vieira I. C., Dupont J.: *Biosensors of Laccase Based on Hydrophobic Ionic Liquids Derived from Imidazolium Cation*. J Brazil Chem Soc 21, 1451-1458 (2010).
  274. Macikova P., Halouzka V., Hrbac J., Bartak P., Skopalova J.: *Electrochemical Behavior and Determination of Rutin on Modified Carbon Paste Electrodes*. Sci World J, DOI: 10.1100/2012/394756, (2012).
  275. Product Monograph <sup>PR</sup>Detrol\* (tolterodine L-tartrate), Pfizer Canada Inc 2010.
  276. Product monograph <sup>PR</sup>Toviaz™ (fesoterodine fumarate), Pfizer Canada Inc. 2012.
  277. Zhang B., Zhang Z., Tian Y., Xu F.: *High performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric determination of tolterodine tartrate in human plasma*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 824, 92-98 (2005).
  278. Macek J., Ptacek P., Klima J.: *Determination of tolterodine and its 5-hydroxymethyl metabolite in human plasma by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B 877, 968-974 (2009).
  279. Yadav M., Upadhyay V., Chauhan V., Solanki G., Jani A., Baxi G. A., Singhal P., Shrivastav P. S.: *LC-MS-MS Separation and Simultaneous Determination of Tolterodine and its Active Metabolite, 5-hydroxymethyltolterodine in Human Plasma*. Chromatographia 72, 255-264 (2010).
  280. Saxena V., Zaheer Z., Farooqui M.: *Stability-indicating HPLC determination of tolterodine tartrate in pharmaceutical dosage form*. Indian J Chem Techn 13, 242-246 (2006).
  281. Xia Z. L., Chen Z. Y., Yao T. W.: *An enantiospecific HPLC method for the determination of (S)-enantiomer impurities in (R)-tolterodine tartrate*. Pharmazie 62, 170-173 (2007).
  282. Puchalska M., Zagrodzka J., Czerniec-Michalik E., Zezula M., Chmiel J., Lumiewski W., Zagrodzki B.: *Determination of the enantiomeric purity and the in-process control by HPLC in the technology for production of optically active*

- ingredients on an example of tolterodine tartrate. *Przem Chem* 91, 358-364 (2012).
283. Palmer L., Andersson L., Andersson T., Stenberg U.: Determination of tolterodine and the 5-hydroxymethyl metabolite in plasma, serum and urine using gas chromatography mass spectrometry. *J Pharmaceut Biomed* 16, 155-165 (1997).
  284. Lehnert P., Pribylka A., Maier V., Znaleziona J., Sevcik J., Dousa M.: Enantiomeric separation of R,S-tolterodine and R,S-methoxytolterodine with negatively charged cyclodextrins by capillary electrophoresis. *J Sep Sci* 36, 1561-1567 (2013).
  285. Sankar D. G., Krishna M. V., Kumar D. V. P., Latha R. M.: UV spectrophotometric determination of tolterodine tartarate and cefepime. *Asian J Chem* 17, 2028-2030 (2005).
  286. Sangoi M. S., Steppe M.: Determination of fesoterodine in pharmaceutical formulations by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom* 16, 653-661 (2010).
  287. Sangoi M. S., Todeschini V., Steppe M.: Second-Order Derivative UV Spectrophotometric Method for the Determination of Fesoterodine and Comparison with LC, CE and LC-MS/MS in Commercial Extended-Release Tablets. *Acta Chim Slov* 59, 136-143 (2012).
  288. Sangoi M. S., Todeschini V., Steppe M.: Fesoterodine stress degradation behavior by liquid chromatography coupled to ultraviolet detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Talanta* 84, 1068-1079 (2011).
  289. Parekh J. M., Sanyal M., Yadav M., Shrivastav P. S.: Investigation of ex vivo stability of fesoterodine in human plasma and its simultaneous determination together with its active metabolite 5-HMT by LC-ESI-MS/MS: Application to a bioequivalence study. *J Chromatogr B* 913, 1-11 (2013).
  290. Macikova P., Skopalova J., Cankar P., Papouskova B., Strakova R., Jirovsky D., Maier V.: Electrochemical Oxidation of Tolterodine. *Electroanal* 25, 205-212 (2013).
  291. Lee W., Ku S. K., Bae J. S.: Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol* 50, 3048-3055 (2012).
  292. Arima H., Ashida H., Danno G.: Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Biosci Biotech Bioch* 66, 1009-1014 (2002).
  293. Abdel-Raheem I. T.: Gastroprotective Effect of Rutin against Indomethacin-Induced Ulcers in Rats. *Basic Clin Pharmacol* 107, 742-750 (2010).
  294. Khan M. M., Raza S. S., Javed H., Ahmad A., Khan A., Islam F., Saffi M. M., Islam F.: Rutin Protects Dopaminergic Neurons from Oxidative Stress in an Animal Model of Parkinson's Disease. *Neurotox Res* 22, 1-15 (2012).
  295. Undeger U., Aydin S., Basaran A. A., Basaran N.: The modulating effects of quercetin and rutin on the mitomycin C induced DNA damage. *Toxicol Lett* 151, 143-149 (2004).
  296. Park S. Y., Bok S. H., Jeon S. M., Park Y. B., Lee S. J., Jeong T. S., Choi M. S.: Effect of rutin and tannic acid supplements on cholesterol metabolism in rats. *Nutr Res* 22, 283-295 (2002).
  297. Panchal S. K., Poudyal H., Arumugam T. V., Brown L.: Rutin Attenuates Metabolic Changes, Nonalcoholic Steatohepatitis, and Cardiovascular Remodeling in High-Carbohydrate, High-Fat Diet-Fed Rats. *J Nutr* 141, 1062-1069 (2011).
  298. Ostrakhovitch E. A., Afanas'ev I. B.: Oxidative stress in rheumatoid arthritis leukocytes: suppression by rutin and other antioxidants and chelators. *Biochem Pharmacol* 62, 743-746 (2001).
  299. Budavari S., O'Neil M. J., Smith A. (Eds.): *The Merck Index*, str. 1428, 12. vydání, Merck, New York 1996.
  300. Yang J., Qian D. W., Jiang S., Shang E. X., Guo J. M., Duan J. A.: Identification of rutin deglycosylated metabolites produced by human intestinal bacteria using UPLC-Q-TOF/MS. *J Chromatogr B* 898, 95-100 (2012).
  301. Jiang P., Buczynski F., Campbell C., Pierce G., Austria J. A., Briggs C. J.: Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F-tataricum*, and *F-homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Res Int* 40, 356-364 (2007).
  302. Kreft I., Fabjan N., Yasumoto K.: Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products. *Food Chem* 98, 508-512 (2006).
  303. Grynová L., Škeříková V., Jandera P., Kellner V., Horna A.: Porovnání výskytu fenolických látek a flavonoidů v českých a zahraničních pivech metodou HPLC s coularray detekcí, str. 47. In: Vitamíny 2003 - přírodní antioxidanty a volné radikály: 3rd international conference Vitamins 2003, Pardubice 15. - 17. 9. 2003, sborník přednášek. Blatná J., Horna A. (Eds.), Univerzita Pardubice 2003.
  304. Jiang L. F., Zhou G. M., Li Y. Y.: Micelle-Mediated Extraction for the Analysis of Chlorogenic Acid, Rutin, and Quercetin in Honeysuckle by Hplc-Uv. *J Liq Chromatogr R T* 34, 1473-1487 (2011).
  305. Bojarowicz H., Marszall M. P., Wnuk M., Gorynski K., Bucinski A.: Determination of Rutin in Plant Extracts and Emulsions by HPLC-MS. *Anal Lett* 44, 1728-1737 (2011).
  306. Danila A. M., Kotani A., Hakamata H., Kusu F.: Determination of rutin, catechin, epicatechin, and epicatechin gallate in buckwheat *Fagopyrum esculentum* moench by micro-high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Agr Food Chem* 55, 1139-1143 (2007).
  307. Wu H. W., Chen M. L., Fan Y. C., Elsebaei F., Zhu Y.: Determination of rutin and quercetin in Chinese herbal medicine by ionic liquid-based pressurized liquid extraction-liquid chromatography-chemiluminescence detection. *Talanta* 88, 222-229 (2012).
  308. Keki S., Deak G., Zsuga M.: Fragmentation study of rutin, a naturally occurring flavone glycoside cationized with different alkali metal ions, using post-source decay matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 36, 1312-1316 (2001).
  309. Petkovic M., Vujacic A., Schiller J., Bugarcic Z., Savic J., Vasic V.: Application of flavonoids - quercetin and rutin - as new matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of Pt(II) and Pd(II) complexes. *Rapid Commun Mass Sp* 23, 1467-1475 (2009).
  310. Guo M. Q., Song F. R., Liu Z. Q., Liu S. Y.: Characterization of non-covalent complexes of rutin with cyclodextrins by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 39, 594-599 (2004).
  311. Zafra A., Juarez W. J. B., Blanc R., Navalon A., Gonzalez J., Vilchez J. L.: Determination of polyphenolic compounds in wastewater olive oil by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 70, 213-218 (2006).
  312. Li X. J., Zhang Y. P., Yuan Z. B.: Separation and determination of rutin and vitamin C in compound rutin tablets by capillary electrophoresis with amperometric detection. *Chinese J Anal Chem* 30, 815-818 (2002).
  313. Zvezdanovic J. B., Stanojevic J. S., Markovic D. Z., Cvetkovic D. J.: Irreversible UV-induced quercetin and rutin degradation in solution studied by UV spectrophotometry and HPLC chromatography. *J Serb Chem Soc* 77, 297-312 (2012).
  314. Morishita T., Ishiguro K., Sato T.: Use of Nuclear Magnetic Resonance method for detection of rutin-degrading enzyme activity in *Fagopyrum esculentum* and *F-tataricum*. *Breeding Sci* 48, 17-21 (1998).
  315. Leona M., Stenger J., Ferloni E.: Application of surface-enhanced Raman scattering techniques to the ultrasensitive identification of natural dyes in works of art. *J Raman Spectrosc* 37, 981-992 (2006).
  316. Ghica M. E., Brett A. M. O.: Electrochemical oxidation of rutin. *Electroanal* 17, 313-318 (2005).
  317. Macíková P.: *Bakalářská práce*. Univerzita Palackého v Olomouci, 2007.
  318. He J. B., Wang Y., Deng N., Zha Z. G., Lin X. Q.: Cyclic voltammograms obtained from the optical signals: Study of the successive electro-oxidations of rutin. *Electrochim Acta* 52, 6665-6672 (2007).
  319. Sokolova R., Ramesova S., Degano I., Hromadova M., Gal M., Zabka J.: The oxidation of natural flavonoid quercetin. *Chem Commun* 48, 3433-3435 (2012).

320. Medvidovic-Kosanovic M., Seruga M., Jakobek L., Novak I.: *Electrochemical and Antioxidant Properties of Rutin*. Collect Czech Chem C 75, 547-561 (2010).
321. Zare H. R., Samimi R., Mazloum-Ardakani M.: *A Comparison of the Electrochemical Behavior of Rutin at an Inactivated, Activated, and Multi Wall Carbon Nanotubes Modified Glassy Carbon Electrode*. Int J Electrochem Sc 4, 730-739 (2009).
322. Zhao J. Z., Yao X. J., Sun D. Z.: *A study on the derivative adsorption chronopotentiometry of the bismuth(III)-rutin system*. Chinese J Anal Chem 32, 946-948 (2004).
323. Zoulis N. E., Efsthathiou C. E.: *Preconcentration at a carbon-paste electrode and determination by adsorptive-stripping voltammetry of rutin and other flavonoids*. Anal Chim Acta 320, 255-261 (1996).
324. Šulc M., Šestáková I.: *Stanovení přírodních polyfenolických antioxidantů na uhlíkové pastové elektrodě modifikované silikagelem*, str. 159. In: Sborník přednášek z XXVII. mezinárodního odborného semináře: Moderní elektrochemické metody, Jetřichovice 21.-24.5.2007. Barek J., Navrátil T. (Eds.), Česká společnost chemická, Praha 2007.
325. Korbut O., Buckova M., Labuda J., Grundler P.: *Voltammetric detection of antioxidative properties of flavonoids using electrically heated DNA modified carbon paste electrode*. Sensors-Basel 3, 1-10 (2003).
326. Franzoi A. C., Spinelli A., Vieira L. C.: *Rutin determination in pharmaceutical formulations using a carbon paste electrode modified with poly(vinylpyrrolidone)*. J Pharmaceut Biomed 47, 973-977 (2008).
327. Zhanga Y., Zhenga J. B.: *Sensitive voltammetric determination of rutin at an ionic liquid modified carbon paste electrode*. Talanta 77, 325-330 (2008).
328. Sun W., Yang M. X., Li Y. Z., Jiang Q., Liu S. F., Jiao K.: *Electrochemical behavior and determination of rutin on a pyridinium-based ionic liquid modified carbon paste electrode*. J Pharmaceut Biomed 48, 1326-1331 (2008).
329. Wang Y., Xiong H. Y., Zhang X. H., Wang S. F.: *Detection of rutin at DNA modified carbon paste electrode based on a mixture of ionic liquid and paraffin oil as a binder*. Microchim Acta 170, 27-32 (2010).
330. Oliveira A. C., Mascaro L. H.: *Characterization of Carbon Nanotubes Paste Electrode and its Application as Rutin Sensor*. Curr Anal Chem 7, 101-109 (2011).
331. Lin X. Q., He J. B., Zha Z. G.: *Simultaneous determination of quercetin and rutin at a multi-wall carbon-nanotube paste electrodes by reversing differential pulse voltammetry*. Sensor Actuat B-Chem 119, 608-614 (2006).
332. Kupka K.: QC.Expert™, Interaktivní analýza dat, Uživatelský manuál, Verze 2.7, TriloByte® Ltd. 2005, str. 155.
333. Michalkiewicz A., Biesaga M., Pyrzynska K.: *Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey*. J Chromatogr A 1187, 18-24 (2008).
334. Marken F., Neudeck A., Bond A. M.: *Electroanalytical Methods, Guide to Experiments and Applications* (Ed.: Scholz F.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2002.
335. Heyrovsky M., Prokopova B.: *Heterogeneous physico-chemical interactions following electrode reaction: Interaction of folates with thiols*. Collect Czech Chem C 62, 172-184 (1997).
336. Levine I. N.: *Physical chemistry, Sixth Edition*, McGraw-Hill, New York 2009, str. 518-523.
337. Brdička R., Dvořák J.: *Základy fyzikální chemie*, Akademia Praha 1977, str. 661-663.
338. Jurva U.: *Thesis, Electrochemistry on-line with mass spectrometry; Instrumental methods for in vitro generation and detection of drug metabolites*. Groningen, 2004, str. 33.
339. Steckhan E.: *Organic Electrochemistry, 4. vydání* (Eds.: Lund H., Hammerich O.), Marcel Dekker, New York 2001, str. 1130.
340. Henze G.: *Polarographie und Voltametrie, Grundlagen und analytische Praxis*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001, str. 120.
341. Hammerich O., Utley J. H. P., Ebersson L.: *Organic Electrochemistry, 4. vydání* (Eds.: Lund H., Hammerich O.), Marcel Dekker, New York 2001, str. 1008.
342. Sangoi M. S., Todeschini V., Goelzer G. K., Steppe M.: *Photochemistry of a novel antimuscarinic drug fesoterodine and identification of its photodegradation products by LC-ESI-MS studies*. J Photoch Photobio A 256, 16-22 (2013).
343. Capasso R.: *A review on the electron ionisation and fast atom bombardment mass spectrometry of polyphenols naturally occurring in olive wastes and some of their synthetic derivatives*. Phytochem Analysis 10, 299-306 (1999).
344. Puig D., Barcelo D., Silgoner I., Grasserbauer M.: *Comparison of three different liquid chromatography-mass spectrometry interfacing techniques for the determination of priority phenolic compounds in water*. J Mass Spectrom 31, 1297-1307 (1996).
345. Parker V. D., Ronlan A.: *Anodic Oxidation of Phenolic Compounds .1. Mechanism of Anodic Oxidation of 2,6-Di-Tert-Butyl Para Cresol*. J Electroanal Chem 30, 502-505 (1971).
346. Schäfer H. J.: *Organic Electrochemistry, 4. Vydání* (Eds.: Lund H., Hammerich O.), Marcel Dekker, New York 2001, str. 893.
347. Hammerich O., Utley J. H. P., Ebersson L.: *Organic Electrochemistry, 4. vydání* (Eds.: Lund H., Hammerich O.), Marcel Dekker, New York 2001, str. 611.
348. Steelink C., Britton W. E.: *Electrochemical Oxidation of Lignin Model Compounds .1. Oxidation of 3,5-Dimethoxy-4-Hydroxy-Alpha-Methylbenzyl Alcohol*. Tetrahedron Lett, 2869-2872 (1974).
349. Andersson S. H., Lindgren A., Postlind H.: *Biotransformation of tolterodine, a new muscarinic receptor antagonist, in mice, rats, and dogs*. Drug Metab Dispos 26, 528-535 (1998).
350. Jovanovic S. V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M. G.: *Flavonoids as Antioxidants*. J Am Chem Soc 116, 4846-4851 (1994).
351. Macíková P.: *Diplomová práce*. Univerzita Palackého v Olomouci, 2009.
352. Kachosangi R. T., Wildgoose G. G., Compton R. G.: *Room temperature ionic liquid carbon nanotube paste electrodes: Overcoming large capacitive currents using rotating disk electrodes*. Electroanal 19, 1483-1489 (2007).
353. Sorokin A. B., Kudrik E. V.: *Phthalocyanine metal complexes: Versatile catalysts for selective oxidation and bleaching*. Catal Today 159, 37-46 (2011).
354. Zagal J. H., Griveau S., Silva J. F., Nyokong T., Bedioui F.: *Metallophthalocyanine-based molecular materials as catalysts for electrochemical reactions*. Coordin Chem Rev 254, 2755-2791 (2010).
355. Morishita T., Yamaguchi H., Degi K.: *The contribution of polyphenols to antioxidative activity in common buckwheat and Tartary buckwheat grain*. Plant Prod Sci 10, 99-104 (2007).
356. Postlind H., Danielson A., Lindgren A., Andersson S. H. G.: *Tolterodine, a new muscarinic receptor antagonist, is metabolized by cytochromes P450 2D6 and 3A in human liver microsomes*. Drug Metab Dispos 26, 289-293 (1998).

# Curriculum vitae

Jméno, příjmení, titul: Pavla Macíková, Mgr.  
Datum a místo narození: 30. dubna 1985 ve Zlíně, Česká Republika  
Trvalé bydliště: Tečovice 283, 763 02 Zlín, Česká Republika  
Kontaktní email: p.macikova@seznam.cz

## Pracovní zkušenosti:

*1. 9. 2013 – dosud*

Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta - vědecký pracovník

*1. 11. 2011 – 31. 8. 2013*

Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta - lektor

*2. 5. 2012 – 31. 7. 2012*

Zahraniční vědeckovýzkumná stáž ve výzkumné skupině prof. Wolfganga Lindnera, Christian Doppler Laboratory for Molecular Recognition Materials, Department of Analytical Chemistry and Food Chemistry, University of Vienna, Austria

## Vzdělání:

*2009 – dosud*

Postgraduální studium analytické chemie na PřF UP Olomouc (předpokládané ukončení 2013), téma: Studium a analytické využití elektrochemických transformací biologicky aktivních látek

*2007 – 2009*

Navazující magisterské studium analytické chemie na PřF UP Olomouc, obhájení diplomové práce na téma: Využití modifikovaných uhlíkových pastových elektrod pro voltametrické stanovení rutinu

*2004 – 2007*

Studium bakalářské chemie na PřF UP Olomouc, obhájení bakalářské práce na téma: Studium oxidačně-redukčních vlastností rutinu a kvercetin

## Jazykové znalosti

Anglický jazyk – vyšší pokročilý, First Certificate in English, Level B2 - prosinec 2010

Německý jazyk – středně pokročilý

Italský jazyk – mírně pokročilý

## Řidičský průkaz - skupina B

## Odborné vědecké zaměření

Analytická chemie, elektrochemie (elektrochemické transformace biologicky aktivních látek, uhlíkové pastové elektrody, biosenzory), elektrochemie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí.

## Pedagogická činnost

- Laboratorní cvičení z Chemické instrumentace pro 3. ročníky bakalářských oborů chemie (2 semestry)
- Laboratorní cvičení „Pokročilá analytická chemie“ pro 1. ročníky navazujícího studia analytické chemie (1 semestr)

## Řešené projekty

- Projekt OP VK č. CZ.1.07/2.3.00/20.0018 „Rozvoj lidských zdrojů pro excelenci ve výzkumu v oblasti nanotechnologií v analytické chemii“ – členka týmu
- Projekt FRVŠ č. 2495/2012/G6 „Inovace úloh a opora výstupů pro laboratorní cvičení zaměřená na instrumentální analytické metody“ – řešitelka
- Projekt FRVŠ č. 1546/2011/G6 „Modernizace a rozšíření úloh do cvičení Chemická instrumentace“ – spoluřešitelka
- Projekt FRVŠ č. 2909/2010/G6 „Inovace obsahu a studijních opor předmětu Projektová výuka v chemii“ – spoluřešitelka
- Členka týmu v projektech studentské grantové soutěže IGA:  
UP PrF\_2013\_030, UP PrF\_2012\_020, UP PrF\_2011\_025, UP PrF\_2010\_028
- CZ.1.05/2.1.00/03.0058 „Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů“ – členka týmu
- CZ.1.07/2.2.00/28.0029 „Modulární výuka jako nástroj odezvy vzdělávacího systému na potřeby praxe“ – členka týmu

## Popularizace vědy a výzkumu

- Přírodovědný jarmark Univerzity Palackého
- Chemický jarmark a přírodovědný cirkus v Ústí nad Labem
- Univerzita dětského věku

## Seznam publikací

- **Macíková P.**, Skopalová J., Cankař P., Papoušková B., Straková R., Jirovský D., Maier V.: *Electrochemical Oxidation of Tolterodine*. *Electroanal* 25, 205-212 (2013).
- Wolrab D., **Macíková P.**, Boras M., Kohout M., Lindner W.: *Strong cation exchange chiral stationary phase - A comparative study in high-performance liquid chromatography and subcritical fluid chromatography*. *J Chromatogr A* 1317, 59-66 (2013).
- Gargano A. F. G., Kohout M., **Macíková P.**, Lämmerhofer M., Lindner W.: *Direct high-performance liquid chromatographic enantioseparation of free alpha-, beta- and gamma-aminophosphonic acids employing cinchona-based chiral zwitterionic ion exchangers*. *Anal Bioanal Chem* 405, 8027-8038 (2013). Počet citací: 1.
- Škríba A., Janková S., Váňa J., Barták P., Bednář P., Fryčák P., Kučera L., Kurka O., Lemr K., **Macíková P.**, Marková E., Nováková P., Papoušková B., Skopalová J., Švecová H., Roithová J.: *Protonation sites and fragmentations of para-aminophenol*. *Int J Mass Spectrom* 337, 18-23 (2013). Počet citací: 1.
- **Macíková P.**, Halouzka V., Hrbáč J., Barták P., Skopalová J.: *Electrochemical Behavior and Determination of Rutin on Modified Carbon Paste Electrodes*. *Sci World J* (2012), DOI: 10.1100/2012/394756. Počet citací: 1.
- Marková E., Smyslová P., **Macíková P.**, Skopalová J., Barták P.: *Study of Anodic Oxidation of 2,4,6-Tribromophenol*. *Chem Listy* 106, 195-199 (2012).
- **Macíková P.**, Skopalová J.: *A Comparison of Various Modified Carbon Paste Electrodes for Determination of Rutin*. *Modern Electrochemical Methods Xxx*, 101-105 (2010).

- Mrázová V., **Macíková P.**, Myjavcová R., Ginterová P., Müller L.: „*E-learningové opory předmětů Projektová výuka v chemii a Cvičení z analytické chemie*“, Media4u Magazine - Journal for Education 7 (2010) 132-137.

#### **Prezentace na odborných setkáních**

- **Macíková P.**, Papoušková B., Kučera L., Cankař P., Jirovský D., Maier V., Skopalová J.: *Investigation of electrochemical oxidation of tolterodine and fesoterodine using electrochemistry combined off-line with HPLC/ESI-MS*, 2<sup>nd</sup> International Workshop on Electrochemistry/Mass Spectrometry, Münster, Germany, 22 – 24. 5. 2013, poster.
- **Macíková P.**, Wolrab D., Kohout M., Boras M., Lemr K., Lindner W.: *Optimization of conditions for a new strong cation exchanger in HPLC and comparison of performance in sub-critical fluid chromatography (subFC)*, 29<sup>th</sup> international Symposium on Chromatography, Torun, Poland, 9. – 13. 9. 2012, poster, Book of abstracts, str. 655.
- Skopalová J., **Macíková P.**, Vacek J., Papoušková B., Cankař P., Maier V.: *Electrochemical generation and LC-MS identification of drug oxidation products*, 14<sup>th</sup> International Conference on Electrochemistry, Portorož, Slovenia, 3. – 7. 6. 2012, poster, Book of abstracts, str. 167.
- **Macíková P.**, Halouzka V., Hrbáč J., Barták P., Skopalová J.: *Electrochemical behavior and determination of rutin on variously modified carbon paste electrodes*, 7<sup>th</sup> Aegean Analytical Chemistry Days 2010, Lesvos, Greece, 29. 9. – 3. 10. 2010, poster, Book of abstracts, str. 153.
- **Macíková P.**, Halouzka V., Hrbáč J., Skopalová J.: *Amperometric determination of rutin on carbon paste electrodes*, X. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků, Brno, 23. – 24. 6. 2010, poster, rozšířený abstrakt ve sborníku příspěvků, str. 147-149.
- **Macíková P.**, Skopalová J.: *Srovnání různě modifikovaných uhlíkových pastových elektrod pro stanovení rutinu*, XXX. Moderní elektrochemické metody, Jetřichovice, 24. – 28. 5. 2010, přednáška, článek ve sborníku přednášek, str. 101-105.