

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



Elektrochemická oxidace derivátů piperazinu

Diplomová práce

Autor: Veronika Lukešová

Vedoucí práce: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

Olomouc 2016

Prohlašuji, že jsem tuto práci napsala samostatně pod vedením RNDr. Jany Skopalové, Ph.D. a veškeré literární zdroje a odborné články jsem uvedla v seznamu použité literatury.

V Přerově dne:

.....

podpis

Poděkování

Mé poděkování patří RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. jak za ochotu a pomoc při měření v laboratoři, tak za její odborné konzultace a podporu při vypracování této diplomové práce. A dále bych ráda poděkovala Katedře analytické chemie za poskytnutí prostor a potřebného vybavení pro realizaci mé diplomové práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Veronika Lukešová

Název práce: Elektrochemická oxidace derivátů piperazinu

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2017

Abstrakt: Cílem práce bylo sledování elektrochemické oxidace sildenafilu citrátu, využití redoxních reakcí pro stanovení analytu a identifikace vznikajících oxidačních produktů pomocí hmotnostní spektrometrie. Elektrochemická oxidace sildenafilu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l byla sledována cyklickou a diferenčně pulzní voltametrií v Britton-Robinsonově pufru o pH 2,00 v přítomnosti 10 % (v/v) acetonitrilu. Mez detekce sildenafilu byla 0,96 $\mu\text{mol/l}$. Vznikající N-desmethylsildenafil a další oxidační produkty byly detekovány v on-line spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií.

Klíčová slova: Sildenafil (Viagra), oxidace, voltametrie, elektrochemie, hmotnostní spektrometrie

Počet stran: 53

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Veronika Lukešová

Title: Electrochemical oxidation of piperazine derivatives

Type of thesis: Master's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

The year of presentation: 2017

Abstract: The aim of this work was to study the electrochemical oxidation of sildenafil citrate, apply the redox reactions for analyte determination and investigate the formed oxidation products. The electrochemical oxidation of sildenafil citrate at concentration $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l was performed by cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry in solution of Britton-Robinson buffer with pH = 2.00 and in the presence of 10 % (v/v) acetonitrile. Limit of detection was 0.96 μ mol/l. Formed N-desmethylsildenafil and other oxidation products were detected by on-line coupling of electrochemistry with mass spectrometry.

Keywords: Sildenafil (Viagra), oxidation, voltammetry, electrochemistry, mass spectrometry

Number of pages: 53

Language: Czech

Obsah

1	Úvod	8
2	Teoretická část	9
2.1	Sildenafil citrát (Viagra)	9
2.2	Metody vhodné ke stanovení sildenafilu a jiných piperazinových derivátů	12
2.2.1	Separační metody (HPLC)	13
2.2.2	Biosenzory	13
2.2.3	Elektrochemické metody	14
2.3	Elektrochemické metody používané k oxidaci sildenafilu a jiných piperazinových derivátů	15
2.3.1	Cyklická voltametrie	15
2.3.1.1	Princip cyklické voltametrie	16
2.3.1.2	Interpretace dat	17
2.3.2	Diferenčně pulzní voltametrie	20
2.3.3	Spojení EC-MS	21
2.3.3.1	Elektrosprej	22
2.3.3.2	Iontová past	25
3	Experimentální část	27
3.1	Použité chemikálie	27
3.2	Technické vybavení	27
3.3	Příprava vzorků, postupy měření	28
3.3.1	Cyklická a diferenčně pulzní voltametrie	28
3.3.2	Elektrochemická oxidace v on-line spojení EC-MS	30
4	Výsledky a diskuze	31
4.1	Elektrochemické chování sildenafilu	31
4.2	Vliv acetonitrilu	32

4.3	Rychlost polarizace elektrody	33
4.4	Závislost na pH	36
4.5	Kalibrace	40
4.6	EC-MS.....	42
5	Závěr.....	49
6	Summary.....	50
7	Literatura	51

1 Úvod

Sildenafil citrát (Viagra) je selektivní inhibitor fosfodiesterázy 5 (PDE5). Jedná se o první prostředek s tímto způsobem účinku při léčbě erektilní dysfunkce, častěji známé jako mužská impotence. Jen ve Spojených státech postihuje tato choroba více než 30 milionů mužů. Tento nový lék byl schválen pro použití na předpis v rámci Spojených států a Evropské unie během roku 1998 a stal se jedním z nejrychleji prodávaných léků všech dob [1]. Kromě léčby erektilní dysfunkce se sildenafil využívá také při léčbě různých kardiovaskulárních onemocnění, např. plicní arteriální hypertenze [2].

Při metabolismu sildenafilu v živých organismech dochází k pěti různým typům reakcí, což popsal D. K. Walker se svými kolegy. Hlavními reakcemi této přeměny jsou N-demethylace piperazinového kruhu, N, N'-deethylace piperazinového kruhu, oxidace piperazinového kruhu, N-demethylace pyrazolu a alifatická hydroxylace. Další metabolity vznikají kombinacemi těchto reakcí [3].

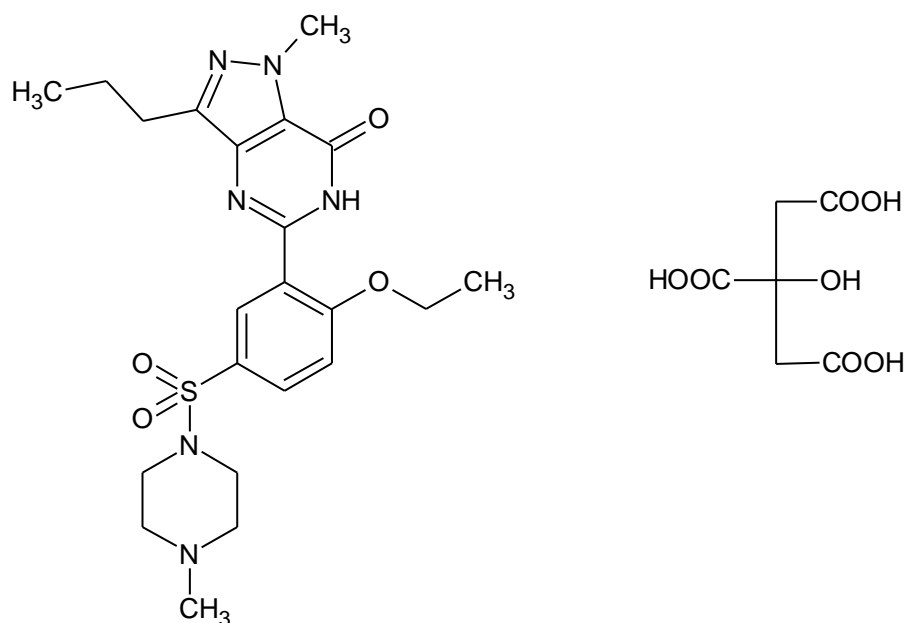
Cílem této práce bylo sledování elektrochemické oxidace sildenafilu pomocí voltametrických technik, zejména cyklické voltametrie a diferenčně pulzní voltametrie. Dále nahlédnutí na reaktivitu molekuly při oxidačních podmínkách, využití elektrochemických reakcí ke stanovení sildenafilu a detekce a identifikace vznikajících oxidačních produktů za použití on-line spojení elektrochemie a hmotnostní spektrometrie.

2 Teoretická část

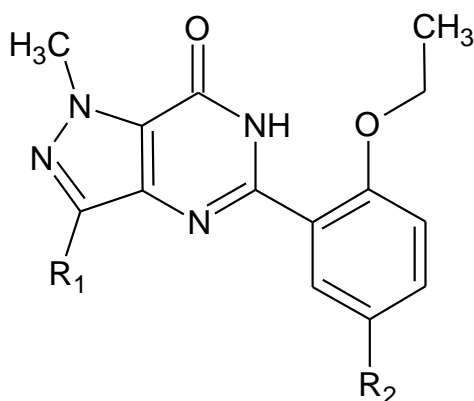
2.1 Sildenafil citrát (Viagra)

Sildenafil inhibuje enzym fosfodiesterázu 5 (PDE5), který se nachází v lidském topořivém tělese a reguluje hladinu cyklického guanosin monofosfátu (cGMP) jeho konverzí na guanosin monofosfát (GMP). Inhibice PDE 5 vede ke zvýšení hladiny cGMP, což zapříčiní lepší relaxaci hladkého svalstva, zvýšený průtok krve a lepší erekci [1]. Původně byl vyvinutý pro léčbu hypertenze. Věřilo se, že inhibitorem PDE se zabrání rozpadu cGMP a následné zvýšení jeho koncentrace umožní buňkám hladkého svalstva v ledvinách a cévám relaxaci, což způsobí pokles krevního tlaku. Sloučenina byla získána tak, aby byla zcela selektivní pro enzymy PDE. Bylo ale zjištěno, že PDE se v ledvinách nenachází, a proto se pozornost zaměřila na léčbu angíny pectoris, která spočívá ve zvýšení průtoku krve do svalů srdce. Počáteční klinické pokusy byly zklamáním, neboť farmakodynamické koncové body nebyly realizovány. Nicméně někteří pacienti uvedli ztopoření penisu jako vedlejší účinek a středem zájmu se tak stala léčba mužské impotence [4].

Sildenafil je chemicky 1-[[3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyfenyl]sulfonyl]-methyl piperazin citrát, jehož chemická struktura je znázorněna na obrázku 1 [2]. Byl objeven firmou Pfizer ve Spojeném království. Výchozím bodem pro navržení sildenafilu byl zaprinast, jeden z mála známých inhibitorů PDE v té době. Skelet této molekuly je vyobrazen na obrázku 2. Změna jádra předlohy na pyrazolopyrimidinon poskytla desetinásobné zvýšení účinnosti pro PDE 5 se zlepšenou selektivitou. Zvětšením délky substituentu R₁ z methylu na propyl se dosáhlo dalšího desetinásobného zvýšení účinnosti. Mnoho R₂ skupin bylo tolerováno, ale sulfonamidy byly vybrány, protože snižují lipofilitu a zvyšují rozpustnost sloučeniny. N-methyl piperazin sulfonamid poskytl nejlepší kombinaci účinnosti a fyzikálních vlastností. Sildenafil je asi jen desetkrát selektivnější pro PDE 5 než pro PDE 6 (z hovězí sítnice), což může odpovídat za některé nežádoucí účinky na zrak, které byly pozorovány [4].



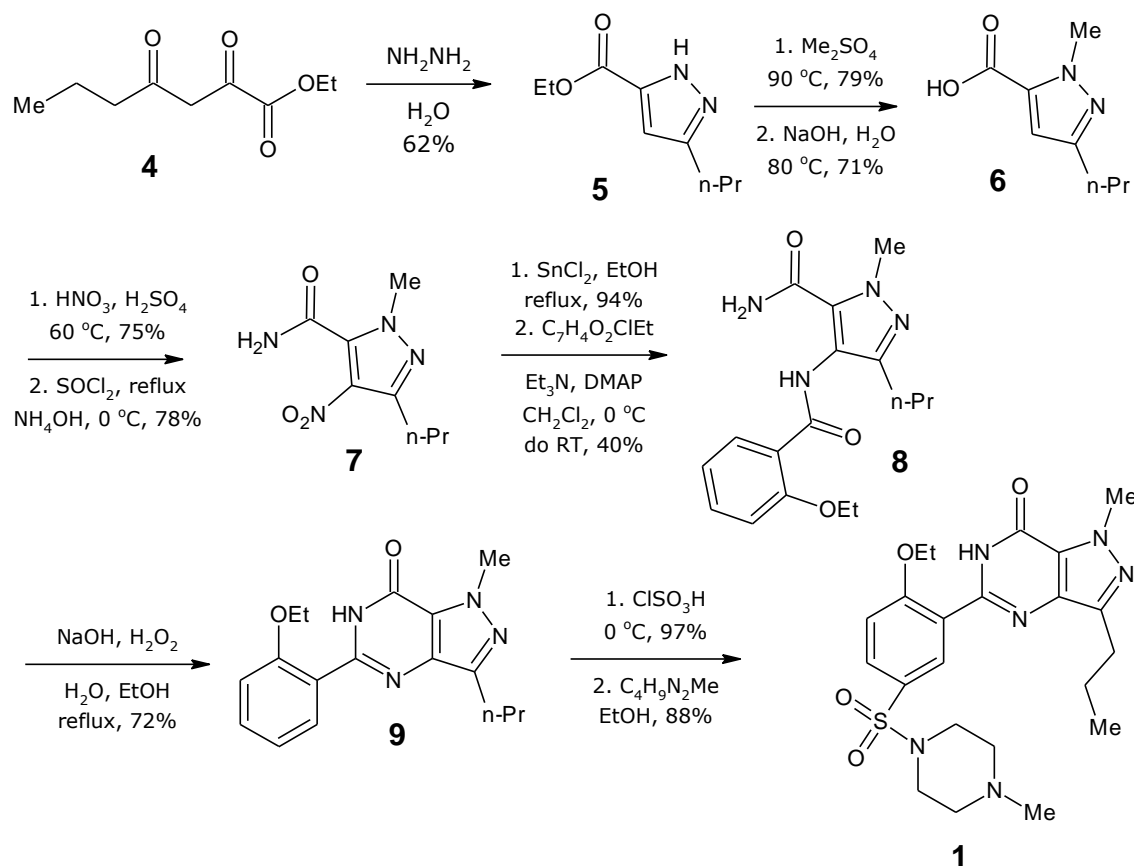
Obrázek 1: Chemický vzorec sildenafilu



Obrázek 2: Chemický skelet zaprinastu

Výroba sildenafilu začíná reakcí 2-pentanonu a diethyloxalátu v přítomnosti epoxidu sodného za vzniku diketoesteru **4**. Kondenzací **4** s hydrazinem vznikne pyrazol **5**. Selektivní methylací 1-pyrazolového dusíku s dimethylsulfátem a následnou hydrolyzou esteru se získá N-methylpyrazol **6**. Poloha 4 v pyrazolu se nitruje směsí dýmavé kyseliny dusičné a kyseliny sírové a následnou reakcí s chloridem thionylu a hydroxidem amonným vzniká amid **7**. Nitroskupina se pak redukuje dihydrátem chloridu cíničitého v přítomnosti ethanolu, čímž se získá požadovaný amin, který se dále acyluje s 2-ethoxybenzoylchloridem za použití triethylaminu a dimethylaminopyridinu jako báze v dichlormethanu. Výsledný benzamidokarboxamid **8**

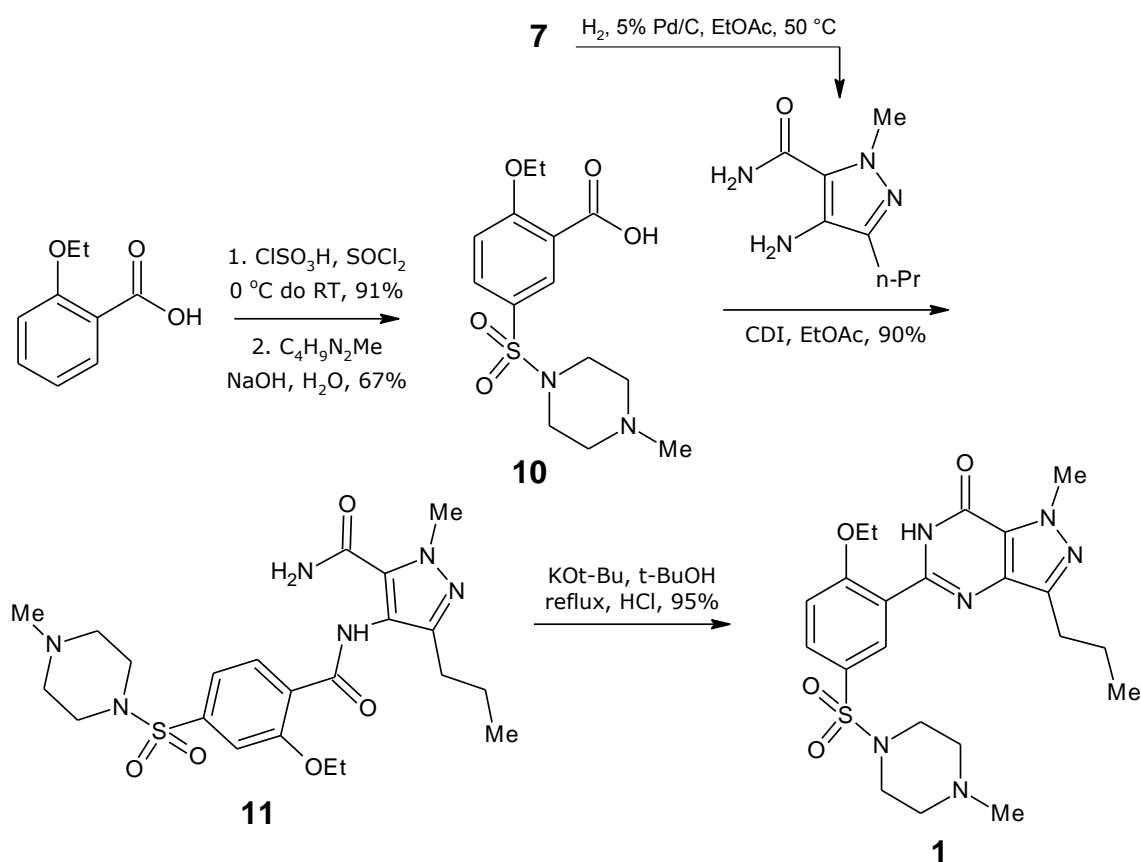
se cyklizuje na pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-on **9** za použití vodného roztoku hydroxidu sodného a peroxidu vodíku v ethanolu pod refluxem. Následně se selektivně sulfonuje para poloha vůči ethoxy skupině v **9** s kyselinou chlorsulfonovou za vzniku sulfonylchloridu, který se nechá reagovat s 1-methylpiperazinem v ethanolu a získá se sildenafil **1** [4]. Tento postup je znázorněn na obrázku 3.



Obrázek 3: Schéma výroby sildenafilu [4]

Popsaná syntetická cesta nebyla optimální pro komerční výrobu, protože syntéza byla zcela lineární a málo výnosná (11 kroků, celkový výtěžek 4,2 % z 2-pentanonu). Proto Pfizer vyvinul podobnou, ale více konvergentní a výnosnější metodu syntézy sildenafilu, která je popsána na obrázku 4. Chlorsulfonace ethoxybenzoové kyseliny byla provedena na začátku syntézy, aby se předešlo vzniku možných toxických meziproductů v posledním kroku původního způsobu výroby. Přídavek 1-methylpiperazinu k sulfonylchloridu byl původně proveden v přítomnosti triethylaminu, avšak tato metoda poskytovala hydrochloridtriethylaminovou podvojnou sůl **10**, která byla velmi málo rozpustná a bylo složité ji použít v následujících krocích. Tuto sůl lze přeměnit na **10** reakcí s vodou. Zlepšený způsob využívá 1 ekvivalent hydroxidu

sodného, čímž se získá **10** přímo. Hydrogenace **7** a acylace vzniklého aminu s aktivovanou kyselinou **10** byly provedeny v jednom kroku za vzniku amidu **11** s 90% výtěžkem. Všechny reakce byly prováděny za použití ethylacetátu jako rozpouštědla, které výrazně zjednodušilo proces a umožnilo efektivní recyklaci rozpouštědla. Konečná cyklizace byla provedena t-butoxidem draselným v t-butanolu, aby se získal sildenafil klinické kvality přímo bez dalšího čištění. Komerční způsob byl dále optimalizován tak, aby se minimalizoval odpad a maximalizovala regenerace rozpouštědla. Pfizer byl za tento způsob výroby sildenafilu oceněn Ústavem chemického inženýrství [4].



Obrázek 4: Komerční výroba sildenafilu [4]

2.2 Metody vhodné ke stanovení sildenafilu a jiných piperazinových derivátů

Nejčastěji používaná rutinní technika pro stanovení léčiv a metabolitů je nepochybně vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), ať už s UV detekcí nebo ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Čím dál tím větší význam však mají modernější metody pro tyto účely např. biosenzory, založené na specifických interakcích stanovené látky

např. s enzymy nebo DNA. Avšak nejčastěji publikovanými technikami jsou elektrochemické metody, neboť piperazinové látky jsou elektroaktivní.

2.2.1 Separční metody (HPLC)

A. M. Y. Jaber se spolupracovníky sledoval složení komerčně vyrobených tablet Viagry a zjistil, že jsou v tabletách přítomny nečistoty, které vznikly při výrobě. Provedl úspěšnou separaci sildenafilu a nečistot na koloně μ Bondapak C₁₈ s UV detektorem. Jako mobilní fázi zvolil acetát amonný s acetonitrilem v poměru 1:1. Mez detekce pro sildenafil stanovil na 0,451 μ g/ml [5].

M. Al-Ghazawi a jeho kolegové se věnovali stanovení sildenafilu a jeho metabolitu N-desmethylsildenafilu v krevní plasmě. Vzorek plasmy odebrali dobrovolníkům 24 hodin po požití tablety Viagry obsahující 50 mg sildenafilu. Separaci a následné stanovení provedli na koloně Hypersil C₈ s amperometrickým detektorem, složeným z pracovní uhlíkové elektrody, referentní argentchloridové elektrody a pomocné platinové elektrody. Mobilní fází byla směs acetonitrilu, methanolu a fosfátového pufru. Mez detekce pro sildenafil byla stanovena na 3,448 ng/ml a mez detekce pro metabolit byla stanovena na 4,59 ng/ml [6].

S. M. van Leeuwen spolu se svými kolegy zkoumal oxidaci clozapinu, což je léčivo, obsahující ve své struktuře N-methylpiperazinový motiv, které se používá k léčbě schizofrenie. Tuto látku oxidoval a sledoval pomocí přímého spojení elektrochemie, kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (EC/LC/MS), což mu umožnilo rychlou a přesnou detekci vznikajících produktů. Nejdůležitějšími reakcemi, které pozoroval, byly N-demethylace, dehydrogenace piperazinového kruhu a hydroxylace chlorbenzenového kruhu molekuly [7].

2.2.2 Biosenzory

J. Raba a jeho kolegové vyvinuli mikrofluidní enzymatický biosenzor. Ten použili pro detekci a následné stanovení kyseliny pipemidové ve farmaceutických vzorcích. Podstatou jejich biosenzoru byla opakovaná oxidace katecholu na o-benzochinon pomocí zakotvené tyrozinázy, která tuto oxidaci katalyzuje a opakovaná zpětná redukce o-benzochinonu na katechol na zlaté elektrodě. Po přidávku pipemidové kyseliny došlo k Michaelově vedlejší reakci přítomného o-benzochinonu za vzniku amino-chinonového derivátu, což způsobilo pokles proudu píku odpovídajícího redukci o-

benzochinonu na katechol. Mez detekce pipemidové kyseliny takto stanovili na 18 nmol/l [8].

K. P. Lee a spolupracovníci modifikovali povrch elektrody ze skelného uhlíku pomocí uhlíkových nanotyčinek pokrytých poly(4-aminobenzen sulfonovou) kyselinou. Tento senzor pak použili k detekci a stanovení sildenafilu, pro který byla mez detekce spočítána na 4,7 pmol/l [9].

A. M. Khalid spolu s kolegy sledoval interakci sildenafilu s DNA pomocí DNA biosenzoru, jenž vytvořil zakotvením DNA na elektrodě ze skelného uhlíku. Indikátorem interakce mezi DNA a sildenafilem byl pokles proudu píku odpovídajícího oxidaci guaninu. Pro tuto studii použil dvě techniky, a to potenciometrii za konstantního proudu a diferenčně pulzní voltametrii [10].

2.2.3 Elektrochemické metody

S. Yilmaz se věnoval detekci a stanovení zopiclonu v tabletách a moči pomocí elektrochemických technik, jako jsou adsorpční rozpouštěcí diferenčně pulzní voltametrie a adsorpční rozpouštěcí Osteryoung square-wave voltametrie. Svě měření prováděl na elektrodě ze skelného uhlíku a určil mez detekce pro rozpouštěcí diferenčně pulzní voltametrii na $2,78 \cdot 10^{-7}$ mol/l a pro square-wave voltametrii na $1,70 \cdot 10^{-7}$ mol/l [11].

S. A. Özkan, B. Uslu, D. Kul a M. Gumustas se zaměřili na detekci a stanovení zaprasidonu v tabletách a krevním séru. Pro svůj výzkum použili borem dopovanou diamantovou elektrodu a typické elektrochemické techniky – cyklickou voltametrii, diferenčně pulzní voltametrii a square-wave voltametrii. Stanovování zaprasidonu v tabletách prováděli ve dvou různých prostředích, a to v acetátovém pufru a zředěné kyselině sírové, protože v pufru byl výraznější první pík, zatímco v kyselině druhý pík. Vzorky krevního séra nijak neupravovali kromě vysrážení proteinů acetonitrilem [12]. Výše zmínění první dva autoři se dále podíleli s kolegou P. Zumanem na zkoumání elektrochemické oxidace sildenafilu na uhlíkových elektrodách. Měření uskutečňovali ve fosfátovém a acetátovém pufru s využitím cyklické voltametrie, diferenčně pulzní voltametrie a square-wave voltametrie. Zároveň s oxidací sildenafilu pozorovali také oxidaci nefazodonu a trazodonu. Popisují, že sildenafil má dva píky v anodické oblasti, přičemž první z nich (u méně kladných hodnot potenciálu) je řízen difúzí, což potvrdili lineární závislostí proudové odezvy na koncentraci a odmocnině ze skenovací rychlosti, zatímco druhý pík je adsorpční. To vysvětlili nelineární závislostí proudové odezvy na

koncentraci sildenafilu a lineární závislosti na skenovací rychlosti. Dále zjistili, že nefazodon je oxidován pouze v jednom kroku, a to při hodnotě potenciálu 0,8 V, což je o 0,2 V méně než v případě sildenafilu. Trazodon je oxidován ve dvou krocích, konkrétně při hodnotách potenciálu 1,1 a 1,2 V [13]. S. A. Özkan a B. Uslu rovněž zkoumali se svými kolegy H. Y. Aboul-Eneinem a R. Doganem elektrochemické chování vardenafilu na elektrodách ze skelného uhlíku. Tuto látku následně stanovovali také v tabletách a krevním séru pomocí cyklické voltametrie, diferenčně pulzní voltametrie a Osteryoung square-wave voltametrie. Mez detekce v krevním séru činila $2,53 \cdot 10^{-8}$ mol/l pro DPV a $2,69 \cdot 10^{-8}$ mol/l pro OSW [14].

K. Tyszczyk a M. Korolczyk se zaměřili na stanovení sildenafilu v tabletách pomocí modifikované elektrody ze skelného uhlíku. Modifikace spočívala v potažení povrchu elektrody olověným filmem. Na tento film pak nechali naadsorbovat sildenafil a následně provedli redukci během celého rozpouštěcího kroku. Tímto způsobem obdrželi celkem tři píky při hodnotách -1,2; -1,33 a -1,45 V. Mez detekce sildenafilu byla $9 \cdot 10^{-10}$ mol/l pro první dva píky a $4,5 \cdot 10^{-9}$ mol/l pro třetí pík [15].

J. Tábořský a spolupracovníci sledovali elektrochemickou oxidaci zopiclonu na statické elektrodě ze skelného uhlíku a také na rotační diskové elektrodě. Pomocí klasických elektrochemických technik, jako jsou cyklická voltametrie, lineární sweep voltametrie a diferenčně pulzní voltametrie, se snažili přiblížit metabolickou přeměnu zopiclonu na N-desmethyl zopiclon, který následně identifikovali pomocí hmotnostního spektrometru [16].

2.3 Elektrochemické metody používané k oxidaci sildenafilu a jiných piperazinových derivátů

Elektrochemické metody jsou velmi specifické, citlivé, rychlé a ekonomicky nenáročné techniky, které lze uplatnit v mnoha různých chemických oborech. Proto se dnes rutinně používají ke stanovení těžkých kovů v životním prostředí. V oblasti analýzy organických sloučenin je lze využít ke stanovení pesticidů v potravinách a také pro stanovení léčiv v biologických materiálech.

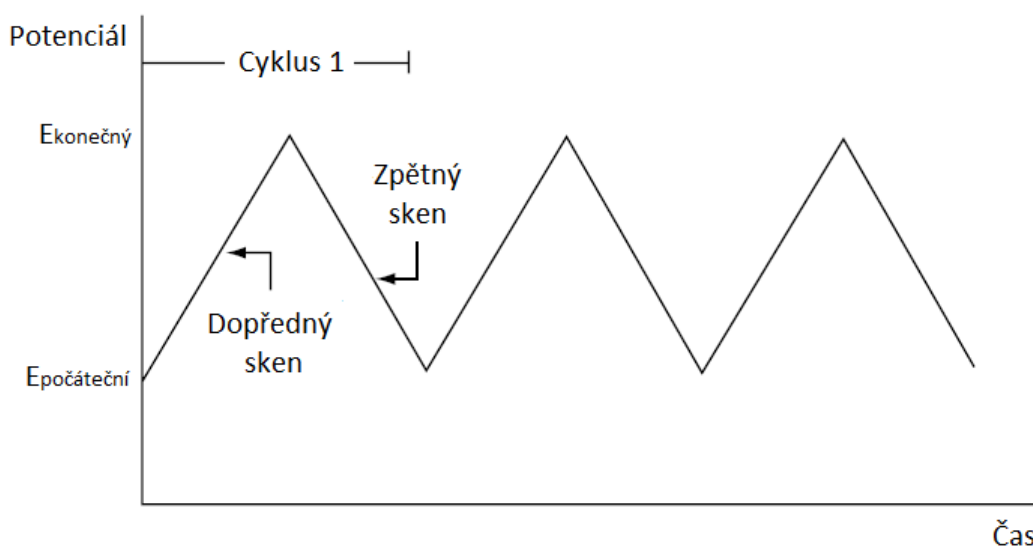
2.3.1 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie je nejhojněji používanou technikou pro získání kvalitativních informací o elektrochemických reakcích. Výhodou této metody je schopnost rychle poskytnout značné množství informací o termodynamice redoxních procesů, dále o

kinetice heterogenních elektronových přenosů a mechanismu následných reakcí či adsorpčních procesech [17]. Je to jedna z nejuniverzálnějších technik pro studium elektroaktivních látek. Všestrannost cyklické voltametrie spolu s jednoduchostí měření vedla k rozšíření použití této metody do oblastí elektrochemie, anorganické chemie, organické chemie i biochemie [18]. Cyklická voltametrie je velmi často prvním provedeným experimentem v elektroanalytické studii [17], protože nabízí nepřehledné množství experimentálních informací a nahlédnutí jak do kinetických, tak do termodynamických podrobností mnoha chemických systémů [19].

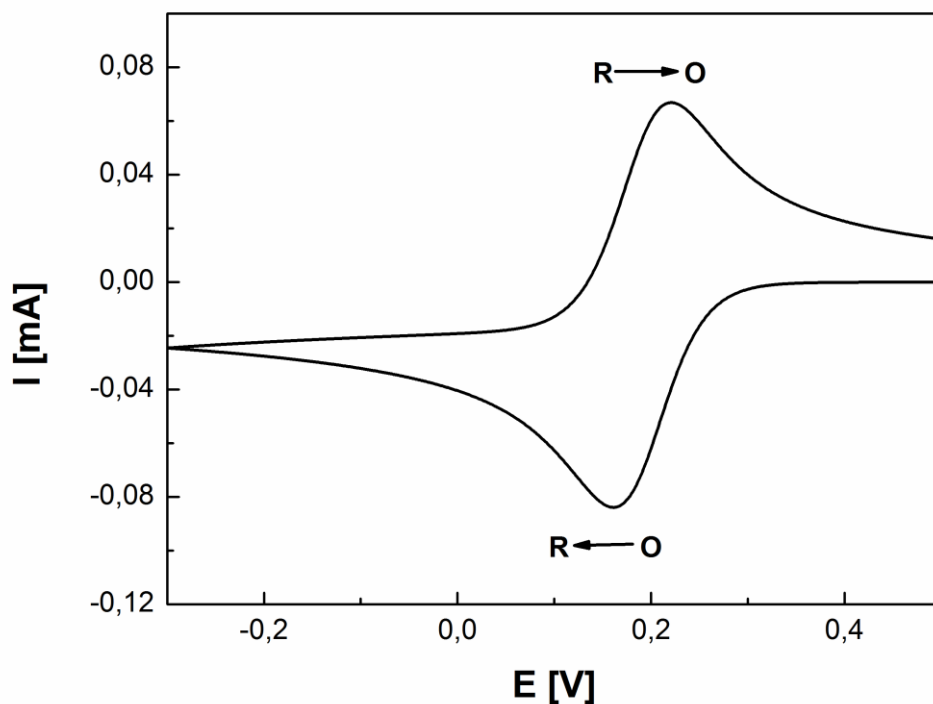
2.3.1.1 Princip cyklické voltametrie

Podstatou cyklické voltametrie je vkládání potenciálu na pracovní elektrodu, která je ponořena v nemíchaném roztoku a měření výsledného proudu. Potenciál pracovní elektrody je vztažen k potenciálu referenční elektrody. Tou může být např. nasycená kalomelová nebo argentchloridová elektroda. Kontrolní potenciál, aplikovaný na tyto dvě elektrody, se nazývá excitační. V cyklické voltametii má excitační potenciál trojúhelníkový tvar, jak je znázorněno na obrázku 5 [18]. Podle potřeby je možné zvolit jednoduché nebo násobné cykly [17].



Obrázek 5: Schéma změny potenciálu v čase během tří cyklů cyklické voltametrie [17]

Příklad proudové odezvy pro typický reverzibilní redoxní pár v průběhu jednoho cyklu je zobrazena na obrázku 6. Jedná se o jednoelektronovou redukci [17].



Obrázek 6: Cyklický voltamogram pro reverzibilní redoxní děj

2.3.1.2 Interpretace dat

Reverzibilní systémy:

V reverzibilním systému platí, že pík odpovídající proudové odezvě je dán Randles-Ševčíkovou rovnicí 1:

$$i_p = (2,69 \cdot 10^5) \cdot n^{2/3} \cdot A \cdot C \cdot D^{1/2} \cdot \nu^{1/2}, \quad (1)$$

kde n je počet vyměňovaných elektronů, A je plocha elektrody, C je koncentrace, D je difuzní koeficient a ν je rychlost skenu. Z této rovnice vyplývá, že proudová odezva je přímo úměrná koncentraci analytu a zároveň roste s druhou odmocninou rychlosti skenu, což svědčí o elektrodové reakci řízené přenosem hmoty (difuze). Pro reverzibilní systém je poměr dopředného a zpětného proudového píku jednotkový. Poloha píku na potenciálové ose je vztažena k formálnímu redoxnímu potenciálu redoxního procesu, který je pro reverzibilní systém umístěn uprostřed mezi potenciálem anodického ($E_{p,a}$) a katodického ($E_{p,c}$) píku, jak popisuje rovnice 2 [17].

$$E^0 = \frac{E_{p,a} + E_{p,c}}{2}, \quad (2)$$

Rozdělení mezi potenciály píků je dáno rovnicí 3 a může být použito pro zjištění počtu vyměňovaných elektronů a jako kritérium pro reverzibilitu redoxního systému [17].

$$\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c} = \frac{0,059}{n}; \quad (3)$$

Potenciálový excitační signál určuje poměr oxidované a redukované formy na povrchu elektrody tak, jak je uvedeno v Nernstově rovnici 4 pro reverzibilní systém [18]:

$$E = E_{red,ox}^{0'} + \frac{0,059}{n} \cdot \log \frac{[ox]}{[red]}, \quad (4)$$

kde $E^{0'}$ je standardní redoxní potenciál, n je počet vyměňovaných elektronů a $[ox]$ a $[red]$ jsou koncentrace oxidované a redukované formy analytu [18].

Kvazi-reverzibilní a ireverzibilní systémy:

Pro kvazi-reverzibilní systém je proud řízen jak přenosem náboje, tak přenosem hmoty. Tvar cyklického voltamogramu je určen funkcí $k^0/\sqrt{(\pi \cdot a \cdot D)}$, přičemž a se vypočítá podle rovnice 5:

$$a = \frac{n \cdot F \cdot v}{R \cdot T}, \quad (5)$$

kde n je počet elektronů, F je Faradayova konstanta, v je rychlost skenu, R je molární plynová konstanta a T je teplota. Jestliže funkce roste, blíží se systém k reverzibilnímu chování, pokud nabývá nízkých hodnot, systém se stává ireverzibilním. Pro tvar voltamogramu platí, že je protáhlejší a vykazuje větší separaci píků na potenciálové ose oproti reverzibilnímu systému [17]. To je pozorovatelné na obrázku 7.

V ireverzibilních systémech bývají píky zmenšené a od sebe vzdálenější oproti reverzibilním systémům. Pro zcela ireverzibilní systémy platí rovnice 6, která popisuje posun píků na potenciálové ose v závislosti na rychlosti skenu:

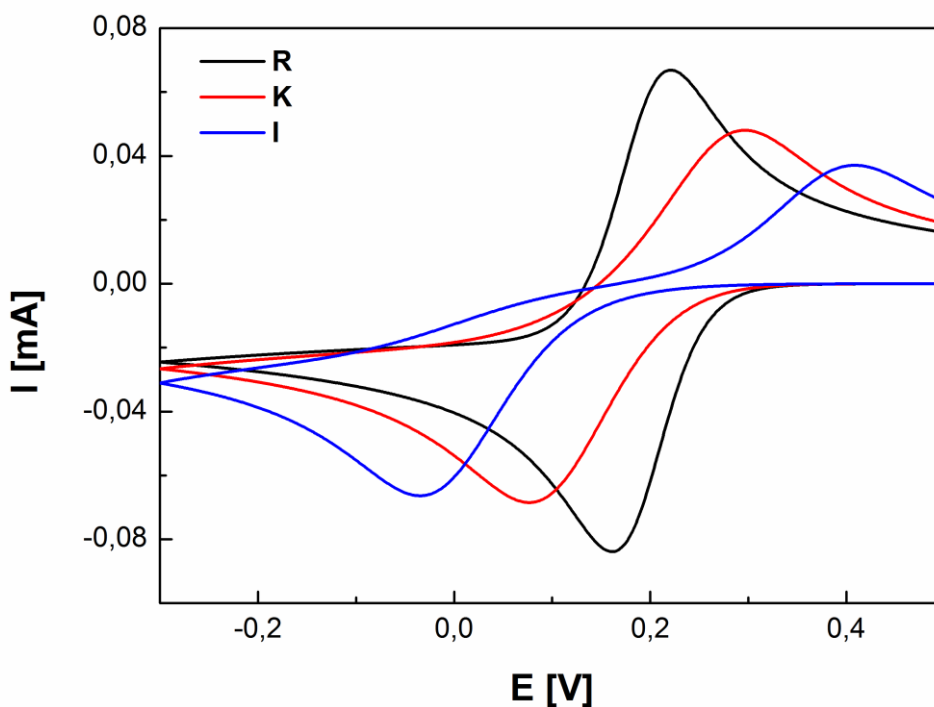
$$E_p = E^0 - \frac{R \cdot T}{\alpha \cdot n_\alpha \cdot F} \cdot \left[0,78 - \ln \frac{k^0}{D^{\frac{1}{2}}} + \ln \left(\frac{\alpha \cdot n_\alpha \cdot F \cdot v}{R \cdot T} \right)^{\frac{1}{2}} \right], \quad (6)$$

kde E^0 je standardní redoxní potenciál, R je molární plynová konstanta, T je teplota, α je koeficient přenosu náboje, n_α je počet elektronů účastnících se přenosu náboje v kroku určujícím rychlost elektrodové reakce, F je Faradayova konstanta, k^0 je standardní rychlostní konstanta, D je difuzní koeficient a v je rychlost skenu [17].

Pro typickou ireverzibilní proudovou odezvu platí Delahayova rovnice 7:

$$i_p = (2,99 \cdot 10^5) \cdot n \cdot (\alpha \cdot n_\alpha)^{1/2} \cdot A \cdot C \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2}, \quad (7)$$

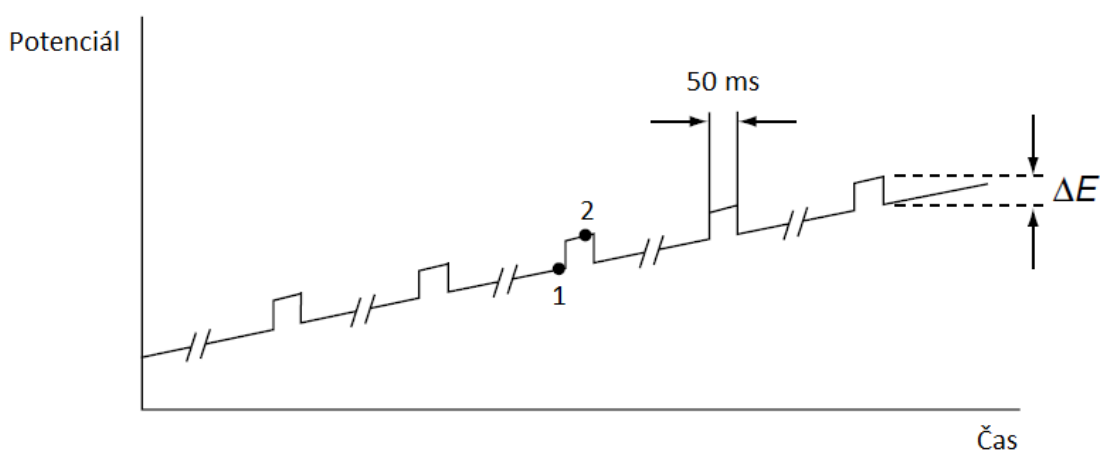
kde n je počet elektronů, α je koeficient přenosu náboje, n_α je počet elektronů účastnících se přenosu náboje v kroku určujícím rychlost elektrodové reakce, A je plocha elektrody, C je koncentrace, D je difuzní koeficient a v je rychlost skenu. Pík je stále přímo úměrný koncentraci, avšak bude nižší, neboť proudová odezva pro ireverzibilní systém odpovídá přibližně 80 % proudové hodnoty v reverzibilním systému [17]. Srovnání tvaru voltamogramů pro všechny systémy ilustruje obrázek 7.



Obrázek 7: Cyklické voltamogram pro reverzibilní děj (R) – černá křivka, kvazi-reverzibilní děj (K) – červená křivka a ireverzibilní děj (I) – modrá křivka

2.3.2 Diferenčně pulzní voltametrie

Diferenčně pulzní voltametrie je extrémně užitečná technika pro měření stopového množství anorganických i organických látek. Při této metodě jsou vkládány na pracovní elektrodu pravoúhlé napěťové pulzy superponované na lineární potenciálovou rampu, jak je vidět na obrázku 8. Proud se měří dvakrát – nejdřív před aplikací pulzu **1** a potom těsně před koncem jeho trvání **2**. První proud se instrumentálně odečte od druhého a rozdíl [$\Delta i = i(t_2) - i(t_1)$] se vynese proti aplikovanému stejnosměrnému napětí [17].



Obrázek 8: Excitační signál pro diferenčně pulzní voltametrii [17]

Výsledný diferenčně pulzní voltamogram se skládá z proudových píků, jejichž výška je přímo úměrná koncentraci odpovídajících analytů, což je popsáno rovnicí 8:

$$i_p = \frac{n \cdot F \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot C}{\sqrt{\pi \cdot t_m}} \cdot \frac{(1 - \sigma)}{(1 + \sigma)}, \quad (8)$$

kde n je počet vyměňovaných elektronů, F je Faradayova konstanta, A je plocha elektrody, D je difuzní koeficient, C je koncentrace, t_m je doba trvání pulzu a σ se vypočítá podle rovnice 9:

$$\sigma = \exp[(n \cdot F / R \cdot T) \cdot (\Delta E / 2)], \quad (9)$$

kde R je molární plynová konstanta, T je teplota a ΔE je amplituda pulsu. Maximální hodnota pro podíl $(1 - \sigma)/(1 + \sigma)$, získaná pro velké hodnoty amplitud pulsů je jednotková [17].

Potenciál píku (E_p) může být využit pro identifikaci látek, stejně jako půlvalnový potenciál ($E_{1/2}$) v klasické polarografii, což je uvedeno v rovnici 10 [17].

$$E_p = E_{1/2} - \Delta E / 2 \quad (10)$$

Diferenčně pulzní mód umožňuje velmi efektivně potlačit nabíjecí proud. Příspěvek nabíjecího proudu je pak zanedbatelný, jak je popsáno rovnicí 11:

$$\Delta i_c \approx -0,00567 \cdot C_i \cdot \Delta E \cdot m^{2/3} \cdot t^{-1/3}, \quad (11)$$

kde C_i je integrální kapacitance, m je hmotnost a t je čas. Příspěvek nabíjecího proudu je tedy o více než jeden řád nižší než u normální pulzní voltametrie, a proto umožňuje diferenčně pulzní voltametrie měření daleko nižších koncentrací analytů, v řádech okolo 10^{-8} mol/l [17].

Odezva ve tvaru píku v případě diferenčně pulzní voltametrie poskytuje také lepší rozlišení látek s podobným redoxním potenciálem. V některých situacích lze rozlišit i látky s redoxními potenciály vzdálenými pouhých 50 mV od sebe. Avšak kvantifikace nezávisí pouze na odpovídajících potenciálech píků, ale také na jejich šířkách. Šířka píku v polovině jeho výšky je nepřímo úměrná počtu vyměňovaných elektronů podle rovnice 12:

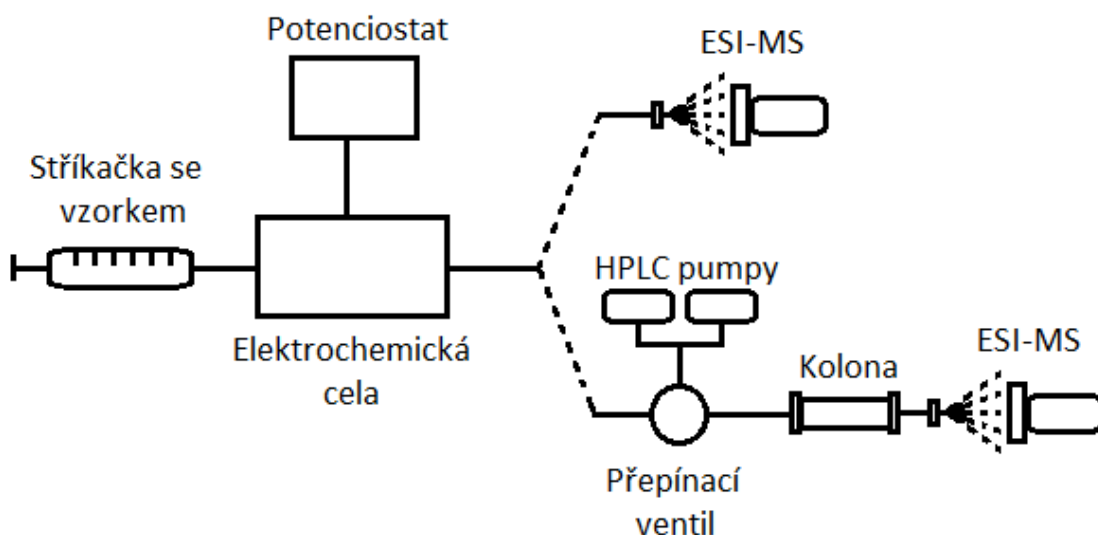
$$w_{1/2} = \frac{3,52 \cdot R \cdot T}{n \cdot F}, \quad (12)$$

a to odpovídá 30,1 mV pro $n = 1$ (25 °C). Díky odezvě ve tvaru píku spolu se sníženou hodnotou proudu pozadí vyniká tato technika zejména v analýzách směsí [17].

2.3.3 Spojení EC-MS

Ačkoli je kombinace elektrochemie (EC) a hmotnostní spektrometrie (MS) často považována za relativně nový a moderní způsob spojení těchto dvou technik, byla poprvé popsána již před více než čtyřiceti lety Bruckensteinem a Gaddem. Tito vědci použili elektrochemii spolu s hmotnostní spektrometrií pro in situ detekci elektrochemických oxidačních produktů, konkrétně vznikajících plynů jako je například

kyslík, během probíhající elektrochemické reakce. S vynalezením ionizace termosprejem (TSP) bylo dále možné sledovat a detekovat netěkavé a polární sloučeniny v roztoku, čehož využili Hambitzer a Heitbaum ke studiu oxidačního procesu N, N-dimethylanilinu. Sledovali vznik dimerů a trimerů v závislosti na vloženém oxidačním potenciálu. Avšak vysoká rychlost průtoku vzorku nutná pro ionizaci termosprejem měla negativní vliv na účinnost konverze elektrochemické oxidace. Proto zájem o on-line spojení elektrochemie a hmotnostní spektrometrie v následujících letech upadl. Nicméně po objevení a popsání ionizace elektrosprejem (ESI) došlo k opětovnému znovunalezení uplatnění kvůli možnosti analyzovat teplotně labilní a netěkavé sloučeniny v roztoku. Přímé spojení elektrochemie s ESI-MS bylo poprvé detailně popsáno van Berkelem a kol. včetně konstrukce cely a způsobu zapojení (připojeno nebo odpojeno od vysokého napětí elektrospreje). Tito vědci dokázali, že přímé spojení EC-MS umožňuje elektrochemickou ionizaci neutrálních molekul, studium elektrodových reakcí a s prekoncentrací stříbrných iontů související nárůst signálu za použití anodické rozpouštěcí voltametrie. Poté počet a typ aplikací elektrochemie prudce vzrostl především v oblasti studií metabolismu [20]. Příklad spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií, příp. i s kapalinovou chromatografií je uveden na obrázku 9.



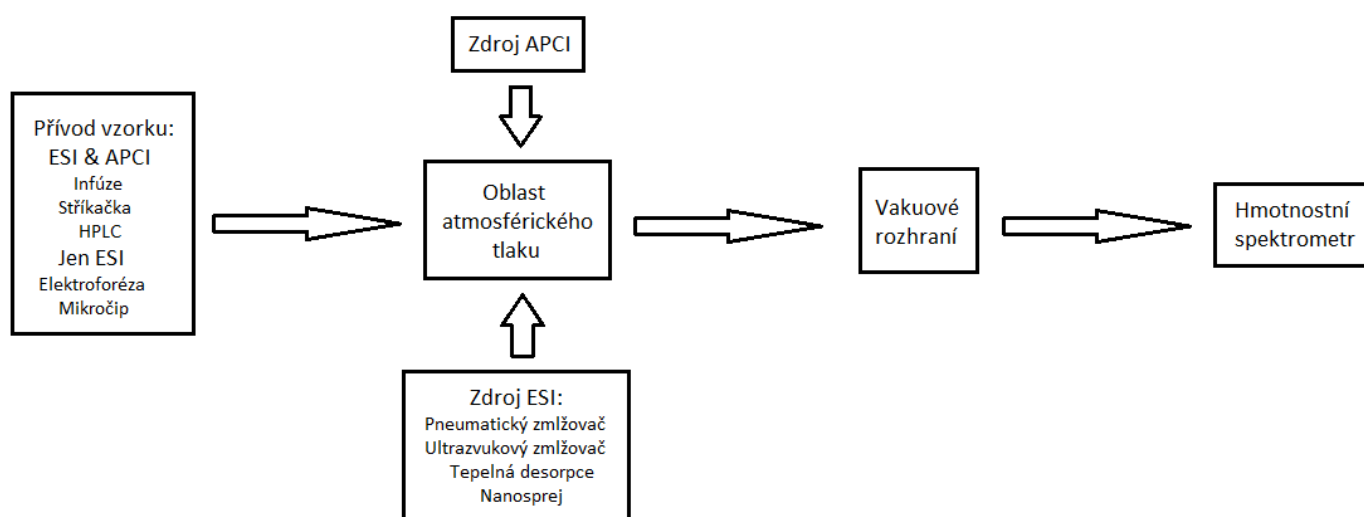
Obrázek 9: Příklad spojení elektrochemie a hmotnostní spektrometrie [20]

2.3.3.1 Elektrosprej

Úspěch elektrospreje odstartoval Fenn a jeho kolegové, když ukázali, že je možné získat mnohonásobně nabitě ionty z proteinů a určit jejich hmotnost pomocí přístroje, který je

limitován hmotnostním rozmezím menším než 2000 Th. Na počátku byl elektrosprej považován výhradně za iontový zdroj určený pro analýzu proteinů. Později se však jeho použití rozšířilo i na analýzu dalších polymerů, biopolymerů a malých polárních molekul. Ukázalo se, že elektrosprej umožňuje dosažení velmi vysoké účinnosti a lze jej snadno spojit s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií či kapilární elektroforézou [21].

Zdroj elektrospreje ve skutečnosti sestává ze dvou samostatných, avšak vzájemně závislých komponent. Oblast atmosférického tlaku zahrnuje vstřikovací jehlu a pomocný hardware a vakuové rozhraní umožňuje transport iontů do hmotnostního spektrometru. V komerčních provedeních je možné zaměnit ionizaci elektrosprejem za chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI) [22]. Blokové schéma zapojení je znázorněno na obrázku 10.



Obrázek 10: Blokové schéma znázorňující jednotlivé části systému [22]

Oblast atmosférického tlaku pro zdroj elektrospreje je typicky tvořena [22]:

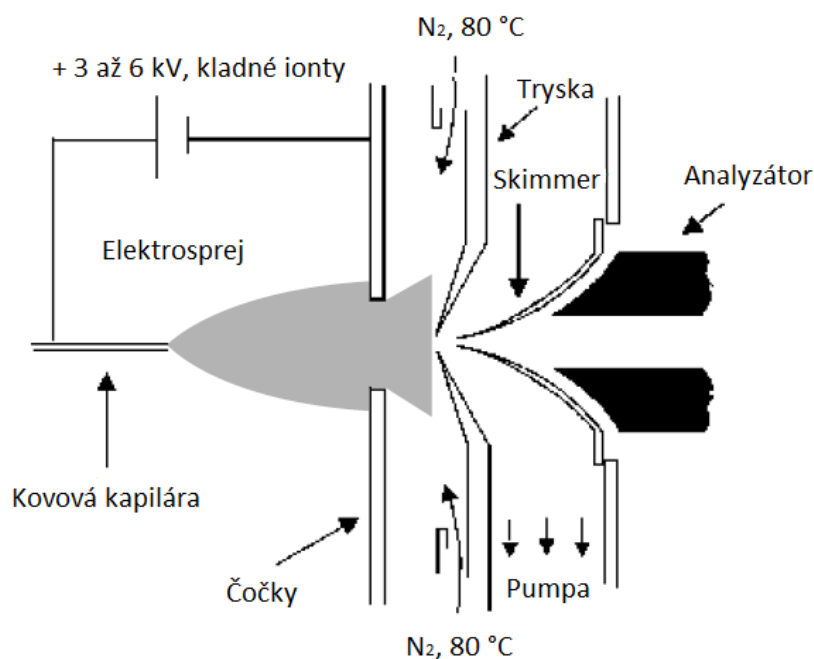
- jehlou elektrospreje, na kterou je vkládáno vysoké elektrické napětí
- zdrojem pro vytvoření elektrického napětí mezi jehlou a vstupem do oblasti za vysokého vakua
- volitelného desolvatačního zařízení (obvykle tepelného nebo pneumatického)

Vakuové rozhraní je většinou tvořeno [22]:

- otvorem nebo kapilárou, kterými jsou přiváděny kapičky spreje
- sadou skimmerů a čerpacích zařízení (pump)

- zařízením pro fokusaci iontů

K ionizaci v elektrospreji dochází působením silného elektrického pole za atmosférického tlaku na kapalinu, která protéká kapilárou relativně pomalým průtokem (běžně 1 – 10 $\mu\text{l}/\text{min}$). Elektrické pole je vyvoláno aplikací elektrického napětí 3 – 6 kV mezi kapilárou a protielektrodu, jejichž vzdálenost je od 0,3 do 2 cm. Vzniklé elektrické pole bývá v řádech 1 MV/m [21]. Schéma elektrospreje je znázorněno na obrázku 11.

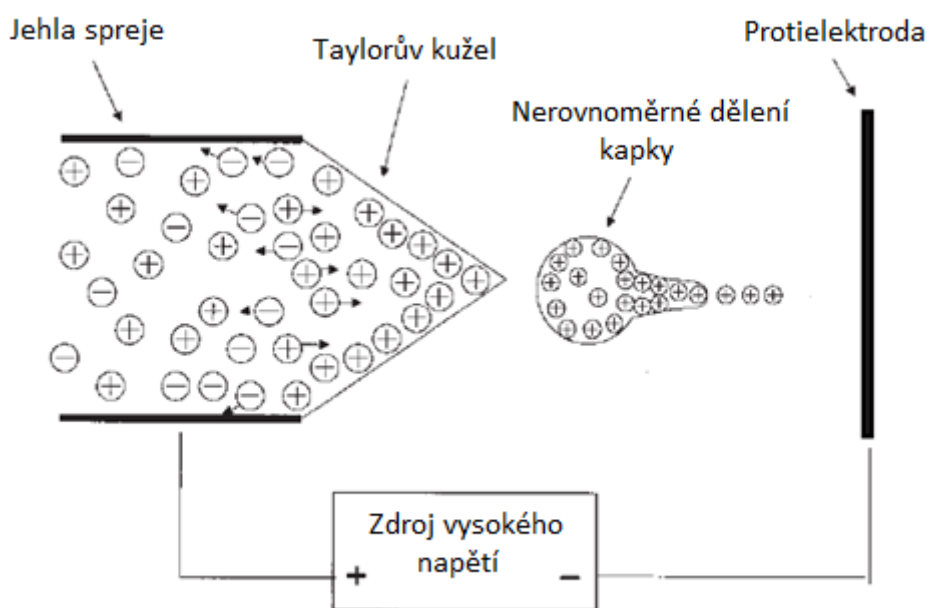


Obrázek 11: Schéma iontového zdroje ESI s použitím skimmeru pro fokusaci iontů a ohřívání dusíku pro desolvaci [21]

Výsledné elektrické pole způsobí akumulaci náboje na povrchu kapaliny na konci kapiláry, což má za následek vznik malých vysoce nabitých kapiček. Plyn přicházející koaxiálně nízkou průtokovou rychlostí umožňuje disperzi spreje omezenou v prostoru. Vzniklé kapičky pak procházejí přes vyhřátý inertní plyn (nejčastěji dusík) nebo ohřívanou kapiláru, aby došlo k odstranění zbytku rozpouštědla [21].

Elektrosprej funguje na principu elektroforézy. To znamená, že používá výsledné elektrické pole k separaci kladných a záporných iontů v roztoku. Je možné měřit v kladném nebo v záporném módu. Například v kladném módu má jehla elektrospreje relativně vysoký kladný potenciál vzhledem k vakuovému otvoru. Anionty jsou přitahovány k hrotu jehly, zatímco kationty převládají v menisku na povrchu

kapaliny. Kladné náboje na povrchu se vzájemně odpuzují a povrch kapaliny expanduje směrem od hrotu jehly. Jestliže jsou elektrostatičká síla a povrchové napětí vyrovnané, povrch kapaliny tvaru kužele má ve vrcholu polovinu úhlu $49,3^\circ$. Tento jev je označován jako Taylorův kužel (podle práce G. Taylora). Se zmenšováním kapky narůstá potenciál a přebytek kladného náboje překonává povrchové napětí, čímž dochází ke vzniku kapiček ze špičky Taylorova kužele [22]. Tento proces je vyobrazen na obrázku 12.



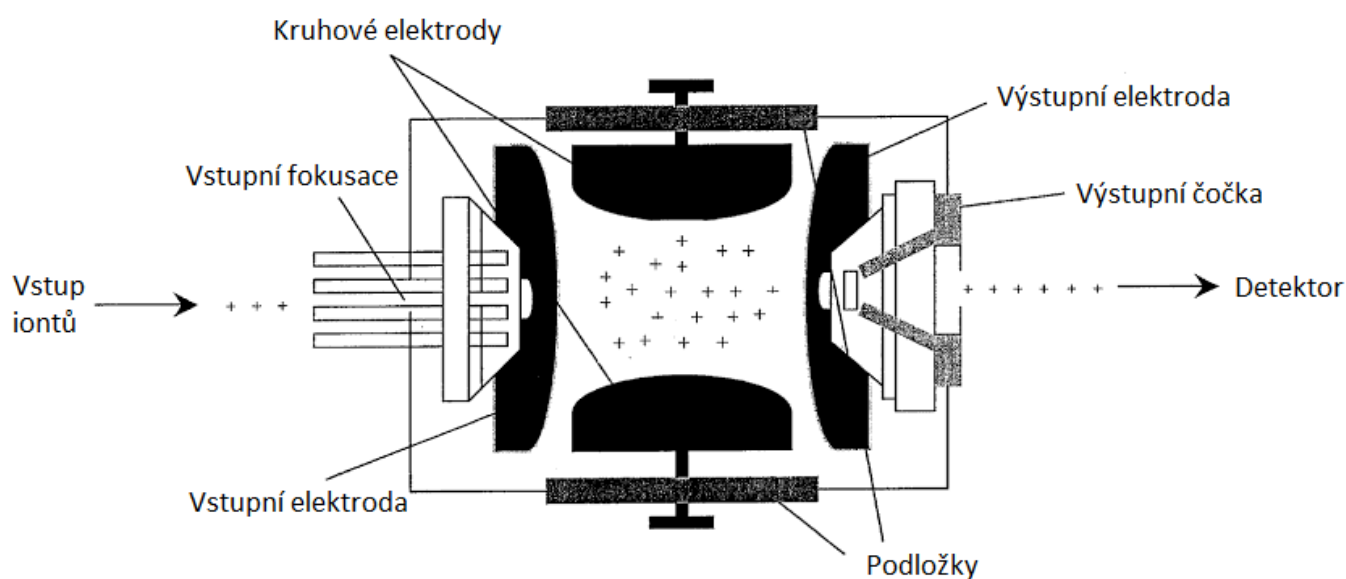
Obrázek 12: Separace náboje a dělení kapky v iontovém zdroji ESI [22]

2.3.3.2 Iontová past

Iontová past je hmotnostní analyzátor, který využívá oscilující elektrické pole pro akumulaci iontů. Pracuje za použití radiofrekvenčního kvadrupólového pole, jenž je schopno chytat ionty ve dvou nebo třech dimenzích. Podle toho se iontové pasti dělí do dvou skupin: 2D a 3D iontové pasti [21].

Iontová past pracuje na jiném principu než kvadrupól nebo TOF. Kvadrupólový hmotnostní analyzátor v podstatě měří ionty, které prochází skrze něj do detektoru, zatímco iontová past sbírá a akumuluje ionty [23]. Iontovou past, jejíž schéma lze vidět na obrázku 13, tvoří kruhové elektrody a dvě koncové elektrody – vstupní a výstupní, na které se vkládá napětí. Ionty jsou přivedeny do pasti krátkým napěťovým pulzem přes otvor vstupní elektrody. Vhodnými poměry napětí vloženého na elektrody jsou

zadrženy uvnitř pasti [21]. Jakmile jsou ionty zachyceny, je možné provést tandemovou hmotnostní spektrometrii. Když je požadovaná manipulace provedena, jsou nahromaděné ionty pomocí postupně se měnícího napětí vypuzovány z cely a detekovány. Celá tato série procesů zachycení, akumulace, manipulace a detekce je uskutečňována v kontinuálním cyklu. Tandemová analýza se provádí tak, že se past naplní všemi přítomnými ionty a potom jsou vybrány konkrétní ionty, které se vypudí. Energie zachycených iontů narůstá a do pasti se přivádí helium, které způsobí kolizi s ionty a jejich následnou fragmentaci. Tyto fragmenty jsou zadrženy v pasti, vypuzovány podle jejich hodnot m/z a detekovány. Fragmentové ionty mohou být také zadržovány v pasti a vystaveny další tandemové analýze. Fragmentace je užitečná pro charakterizaci malých molekul [23].



Obrázek 13: Schéma iontové pasti [23]

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Sildenafil citrát, Santa Cruz Biotechnology

Britton – Robinsonův pufr (pH 1,78 – 11,98):

- Kyselina octová, p. a., Sigma-Aldrich
- Kyselina boritá, p. a., Lachema
- Kyselina fosforečná, p. a., Fluka

Hydroxid sodný, p. a., Lach-ner

Kyselina mravenčí, Suprapur® 98 – 100%, Merck

Acetonitril, (pro HPLC), VWR Chemicals

3.2 Technické vybavení

EkoTribo polarograf, Polaro-Sensors Praha

Elektrody:

- Pracovní: Elektroda ze skelného uhlíku
- Referentní: Argentchloridová elektroda
- Pomocná: Platinový drátek

pH metr, inoLab WTW series

Elektromagnetická míchačka, IKA Lab Disc

Ultrazvuková vodní lázeň, Bandelin sonorex digitech

Analytické váhy, Mettler Toledo

Hmotnostní spektrometr, Agilent 1100 Series LC/MSD Trap

Pro on-line zapojení dále:

- Cella: Conditioning Cell 5021A, ESA
 - Pracovní elektroda z porézního grafitu
 - Referentní hydrogenpaladiová elektroda
 - Pomocná platinová elektroda
- Pumpa: Syringe Pump, New Era Pump Systems, Inc.
- Potenciostat: Detector ADLC 1, Laboratorní přístroje Praha

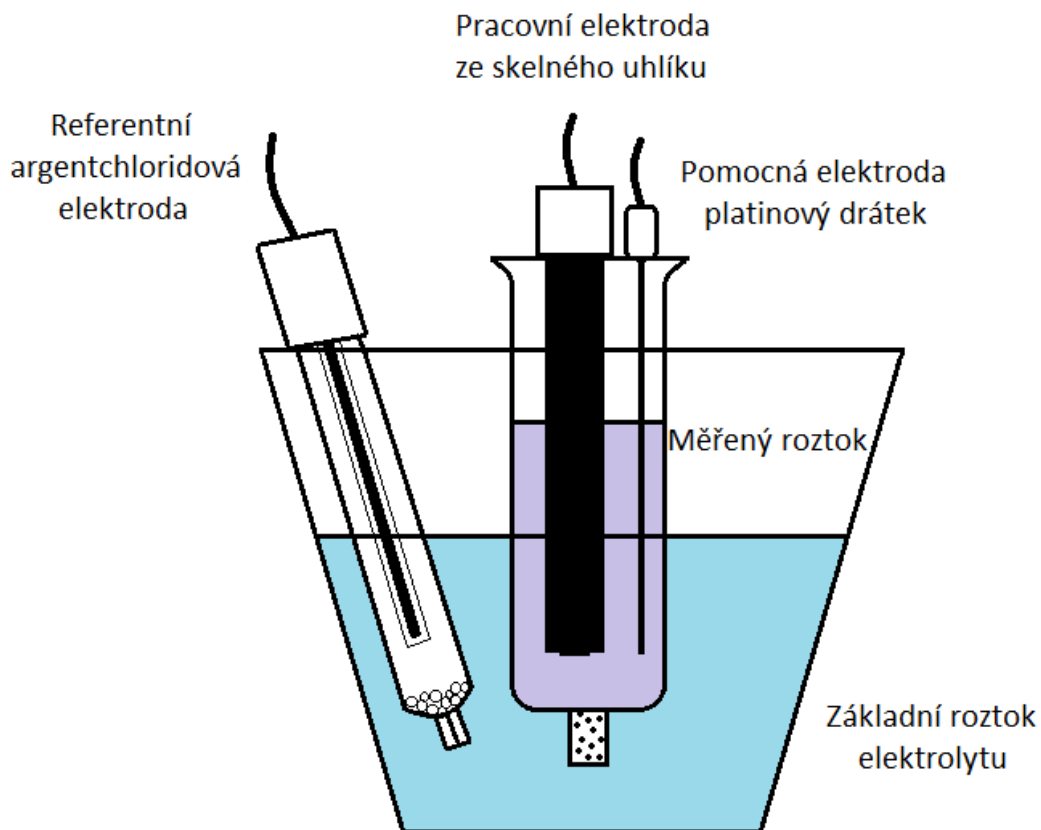
3.3 Příprava vzorků, postupy měření

3.3.1 Cyklická a diferenčně pulzní voltametrie

Do připravené voltametrické cely byl nalit základní Britton-Robinsonův pufr tak, aby hladina dosahovala přibližně do 2/3 výšky. Do této cely byla následně vložena menší nádobka zakončená vycorovou fritou, do které byl pipetován měřený roztok. V tomto případě byl měřený roztok složen z Britton-Robinsonova pufru upraveného na požadovanou hodnotu pH, z destilované vody a standardního roztoku sildenafilu citrátu. Bylo sledováno elektrochemické chování sildenafilu při pH 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 a 10,00. (Důkladnější zkoumání vlivu pH je popsáno dále). Dovnitř cely byla umístěna referentní argentschloridová elektroda a dovnitř menší nádoby byly vkládány pracovní elektroda a pomocná platinová elektroda. Měření bylo prováděno oběma metodami (cyklická voltametrie i diferenčně pulzní voltametrie). Parametry měření jsou uvedeny v tabulce 1. Pracovní elektroda byla před každým měřením důkladně vyleštěna na lešticí podložce se suspenzí aluminu (velikost částic 50 nm) a ponechána 1 minutu ve zkumavce s destilovanou vodou v ultrazvukové vodní lázni. Schéma zapojení je znázorněno na obrázku 14.

		Cyklická voltametrie	Diferenčně pulzní voltametrie
Potenciál:	Počáteční:	0 mV	0 mV
	Konečný:	1500 mV	1500 mV
Rychlost:		100 mV/s	20 mV/s
Počet skenů:		2	1
Výška pulzu:		-	50 mV
Šířka pulzu:		-	80 ms

Tabulka 1: Přehled nastavovaných parametrů pro cyklickou voltametrii a diferenčně pulzní voltametrii



Obrázek 14: Elektrochemická aparatura

Po základním prozkoumání elektrochemického chování sildenafilu byly sledovány další vlivy jednotlivých složek roztoku a také parametrů přístroje. Nejprve byl sledován vliv acetonitrilu v rozmezí 0 až 40 % (v/v).

Dále byla pozorována závislost na použité rychlosti skenu. Experiment se prováděl jak s přidavkem 10 % (v/v) acetonitrilu, tak bez něj. K měření byla použita cyklická voltametrie, přičemž skenovací rychlost byla nastavena na hodnoty 20; 40; 60; 80; 100; 200; 300 a 400 mV/s.

Následně byla sledována závislost na pH. Roztok Britton-Robinsonova pufru byl upraven hydroxidem sodným na hodnoty pH 1,78; 2,00 a dále byla hodnota zvyšována vždy o 0,5 až do hodnoty 11,50 a poslední roztok měl výsledné pH 11,98. Do roztoku bylo také přidáváno 10 % (v/v) acetonitrilu a měření bylo prováděno diferenčně pulzní voltametří.

V dalším experimentu byla měřena kalibrace roztoku sildenafilu. Koncentrace byla sledována v rozmezí 1 až 100 $\mu\text{mol/l}$ za přítomnosti 10 % (v/v) acetonitrilu. K měření byla využita technika diferenčně pulzní voltametrie.

3.3.2 *Elektrochemická oxidace v on-line spojení EC-MS*

Do větší vialky byl připraven roztok pro měření, který se skládal z kyseliny mravenčí o koncentraci 0,05 mol/l, 10 % (v/v) acetonitrilu, sildenafilu o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l a destilované vody.

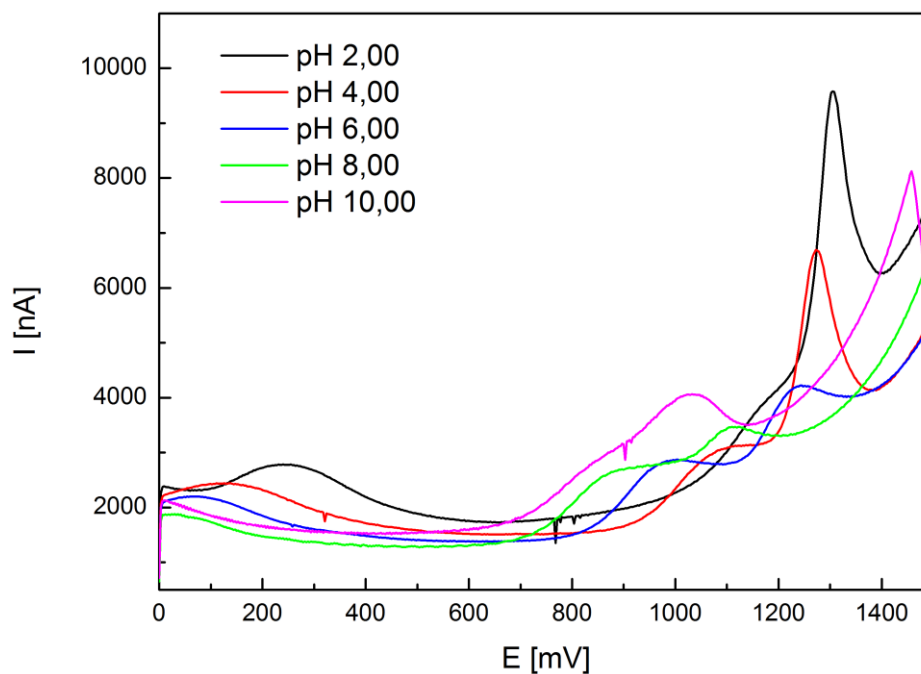
Nejprve byly optimalizovány parametry pro hmotnostní spektrometrii. Zkoumal se vliv teploty v iontovém zdroji, průtoku a tlaku sušícího plynu a napětí na kapiláře na intenzitu odezvy sildenafilu. Teplota byla nastavována postupně na 120 °C, 150 °C, 170 °C, 200 °C a 230 °C. Vliv tlaku a průtoku sušícího plynu byl sledován při hodnotách 7 psi a 2 l/min, dále 10 psi a 3 l/min a nakonec 15 psi a 7 l/min. Posledním sledovaným parametrem bylo napětí na kapiláře, jehož hodnoty byly měněny vždy po 500 V od 2 500 V do 4 000 V pro kladný mód a od 2 000 V po 3 500 V pro záporný mód. Jelikož zde neprobíhala elektrochemická oxidace, byla cela odpojena a vzorek se nastříkoval přímo do iontového zdroje, kde se sledovala intenzita protonované molekuly sildenafilu $[M+H]^+$ s m/z 475 v kladném módu a deprotonované molekuly $[M-H]^-$ s m/z 473 v záporném módu.

Pro sledování elektrochemické oxidace sildenafilu, byla k hmotnostnímu spektrometru připojena coulometrické cela a potenciostat, na kterém byl nastavován polarizační potenciál, jehož hodnoty se postupně zvyšovaly z 0 V na 0,1 V, 0,2 V, 0,3 V a potom po 50 mV až do hodnoty 1 V. Rychlost průtoku měřeného roztoku byla ve všech případech 4 μ l/min.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Elektrochemické chování sildenafilu

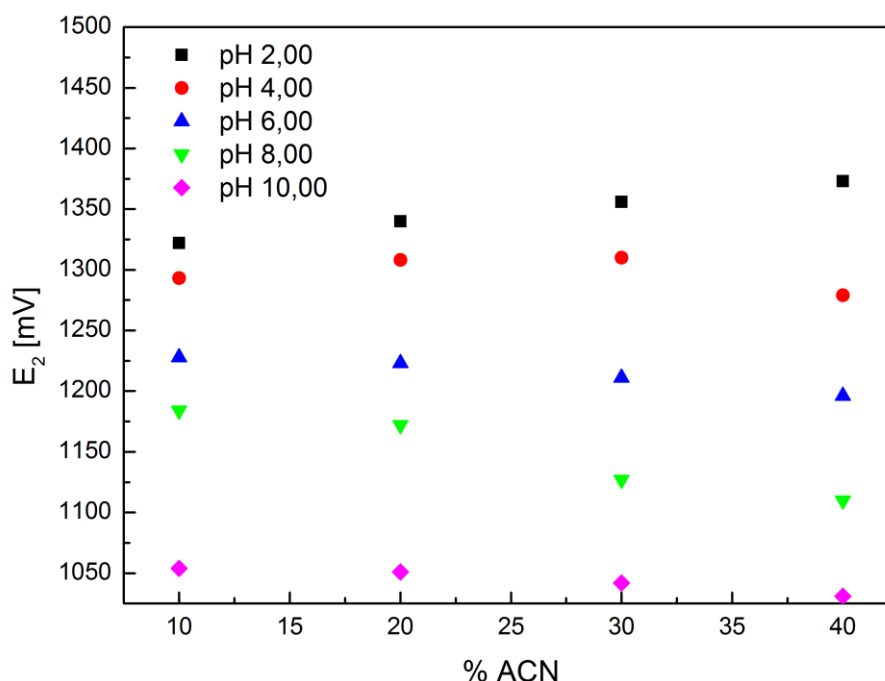
Elektrochemické chování sildenafilu bylo sledováno cyklickou a diferenčně pulzní voltametrií v Britton-Robinsonových pufrích o pH 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 a 10,00. Koncentrace sildenafilu v měřeném roztoku byla $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Cyklická voltametrie poskytla proudové odezvy sildenafilu pouze v anodickém směru polarizace. Nepřítomnost proudových píků na katodické větvi voltamogramu svědčí o ireverzibilitě elektrochemické reakce. Obrázek 15 ukazuje diferenčně pulzní voltamogramy pro různé hodnoty pH. První pík, který se nachází přibližně u hodnoty potenciálu 1,2 V v kyselějších roztocích, je nejvíce zřetelný při hodnotách pH 6,00 a 8,00. Druhý pík, nacházející se u kladnějších hodnot potenciálu je naopak největší v kyselém prostředí. V grafu je patrné, že s rostoucí hodnotou pH dochází k výraznému posunu obou píků k nižším hodnotám potenciálu a také ke zmenšování druhého píku.



Obrázek 15: Diferenčně pulzní voltamogramy sildenafilu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) pro různé hodnoty pH Britton-Robinsonova pufru

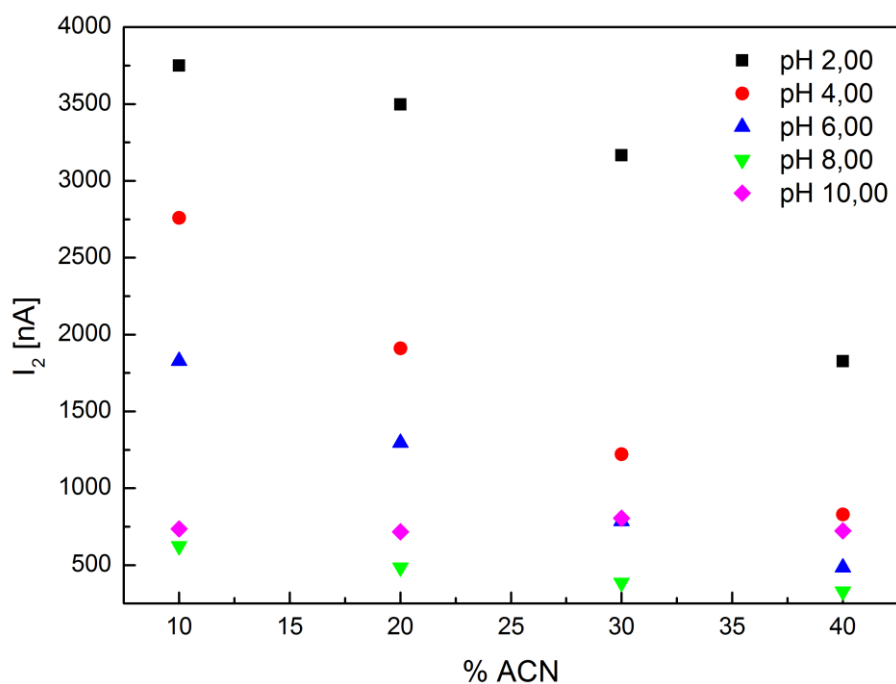
4.2 Vliv acetonitrilu

Vliv acetonitrilu byl také sledován pro pět různých hodnot pH v rozsahu 2,00 až 10,00. Přídavek acetonitrilu se pohyboval od 10 do 40 % (v/v) a jeho vliv se projevil především na výšce a poloze druhého píku. Na obrázku 16 je zřetelné, že při hodnotě pH 2,00 dochází se zvyšujícím se přídavkem acetonitrilu k posunu píku ke kladnějším hodnotám potenciálu. U hodnoty pH 4,00 nastává zlom, kdy se nejprve (pro přídavky 10 až 30 % (v/v) acetonitrilu) pík posouvá k vyšším hodnotám a při 40 % (v/v) acetonitrilu je posunutý k nižšímu potenciálu. Pro ostatní hodnoty pH 6,00 až 10,00 byl s rostoucím obsahem acetonitrilu pozorován posun píku k nižším hodnotám potenciálu.



Obrázek 16: Závislosti potenciálu druhého DPV píku sildenafilu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) na objemovém obsahu acetonitrilu v roztocích Britton-Robinsonova pufru o různých hodnotách pH

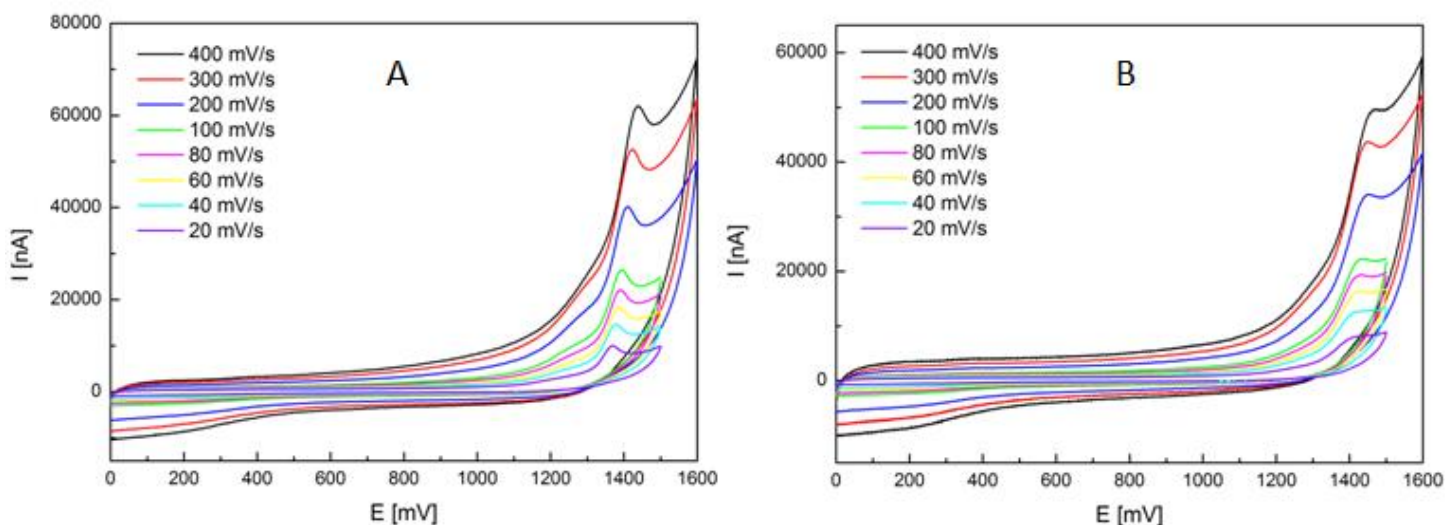
Pro hodnoty proudu jednoznačně platí, že se zvyšujícím se obsahem acetonitrilu dochází ke zmenšování píku, což lze pozorovat na obrázku 17. Jen pro hodnotu pH 10,00 není pozorován ani výrazný pokles, ani výrazný nárůst hodnot proudu. Proto byl zvolen přídavek 10 % (v/v) jako optimální pro sledování dalších závislostí a vlivů.



Obrázek 17: Závislost proudové odezvy druhého DPV píku sildenafilu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) na objemovém obsahu acetonitrilu v roztocích Britton-Robinsonova pufru o různých hodnotách pH

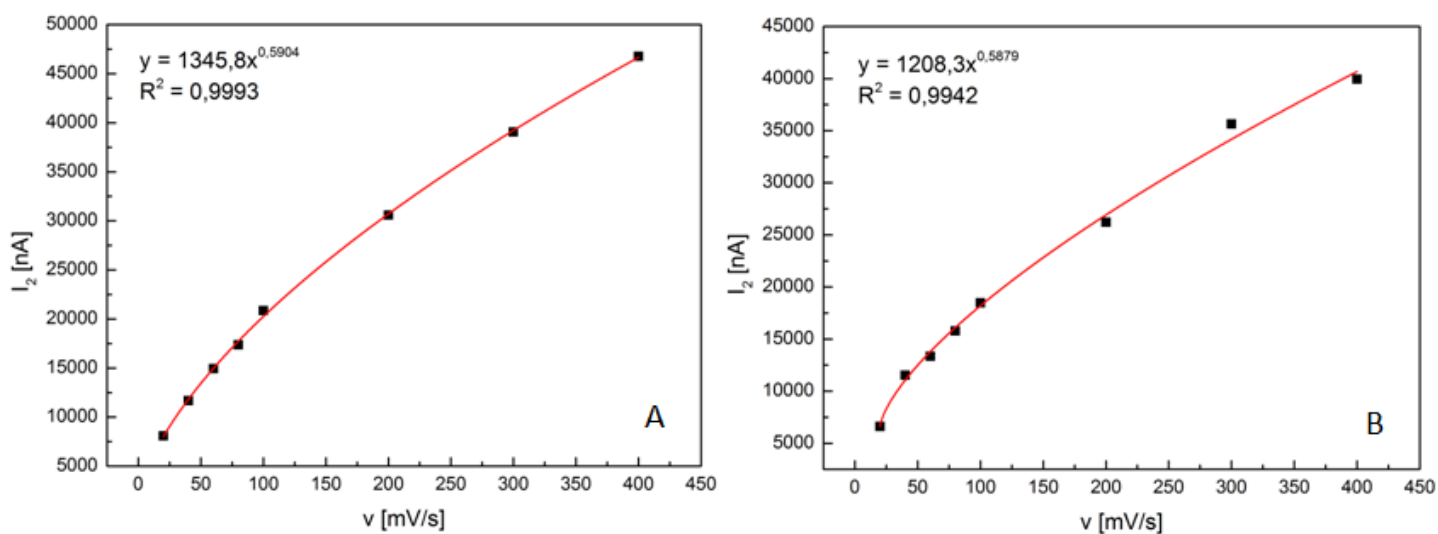
4.3 Rychlost polarizace elektrody

Vliv polarizační rychlosti na proudovou odezvu sildenafilu byl sledován v roztocích jak s přídavkem 10 % (v/v) acetonitrilu, tak bez něj. Rychlost skenu v cyklické voltametii byla nastavována od 20 mV/s do 400 mV/s. S rostoucí rychlostí skenu se píky posouvaly ke kladnějším potenciálům, což je vidět na obrázku 18. Na první pohled je zřejmé, že acetonitril způsobuje zmenšení druhého píku a téměř vymizení prvního píku (obrázek 18B). Navíc v jeho přítomnosti také dochází k posunu obou píků ke kladnějším hodnotám potenciálu stejně, jako to bylo popsáno v kapitole 4. 2.

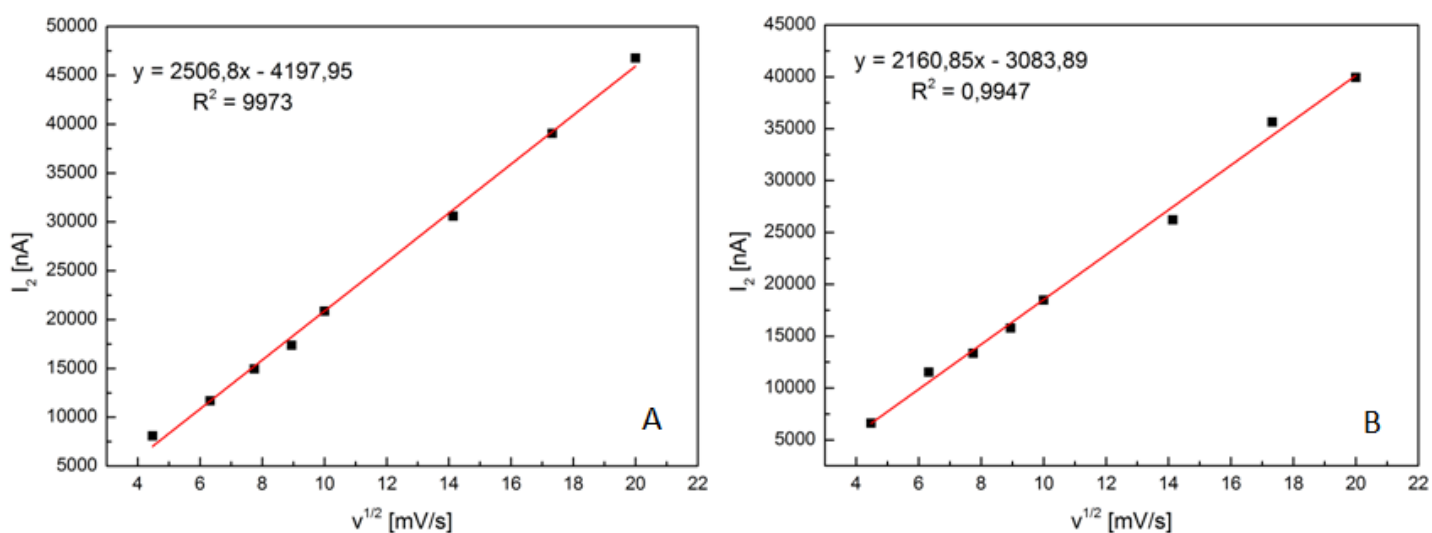


Obrázek 18: Cyklické voltamogramy sildenafilu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) v roztoku Britton-Robinsonova pufru o $\text{pH} = 2,00$ při různých skenovacích rychlostech, A – bez přidavku acetonitrilu, B – s přidavkem 10 % (v/v) acetonitrilu

Na obrázku 19 je znázorněna závislost proudu druhého píku na skenovací rychlosti pro roztoky bez acetonitrilu (obrázek 19A) a s 10 % (v/v) acetonitrilu (obrázek 19B). Zuman a spol. [13] ve své práci uvádějí, že proudová odezva pro druhý pík v závislosti na rychlosti polarizace elektrody by měla být lineární, neboť se podle nich jedná o pík adsorpční. V našem případě však byla pozorována nelineární závislost. Naopak byla lineární závislost proudové odezvy druhého píku na odmocnině ze skenovací rychlosti, což lze vidět na obrázku 20. Pro první pík platila rovněž lineární závislost na odmocnině z rychlosti skenu, což je v souladu s prací Zumana a kol. [13].

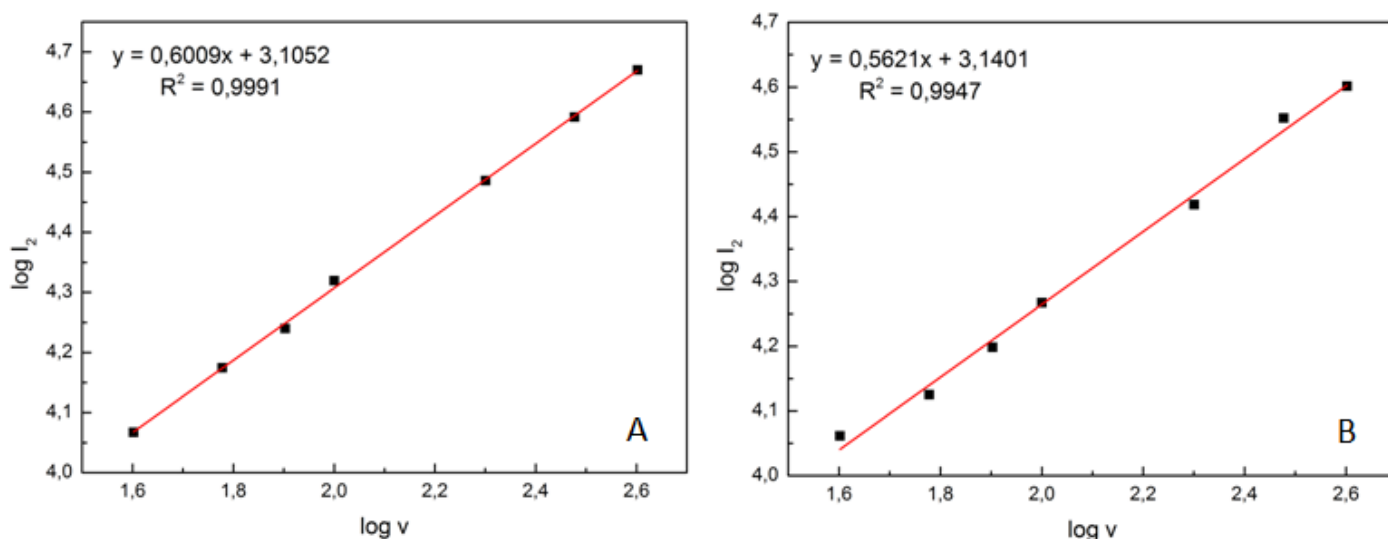


Obrázek 19: Závislost proudové odezvy druhého píku sildenafilu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) na skenovací rychlosti, A - graf pro závislost naměřenou bez přidavku acetonitrilu, B – s přidavkem 10 % (v/v) acetonitrilu



Obrázek 20: Závislost proudové odezvy druhého píku sildenafilu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) na odmocnině ze skenovací rychlosti, A - graf pro závislost naměřenou bez přidavku acetonitrilu, B – s přidavkem 10 % (v/v) acetonitrilu

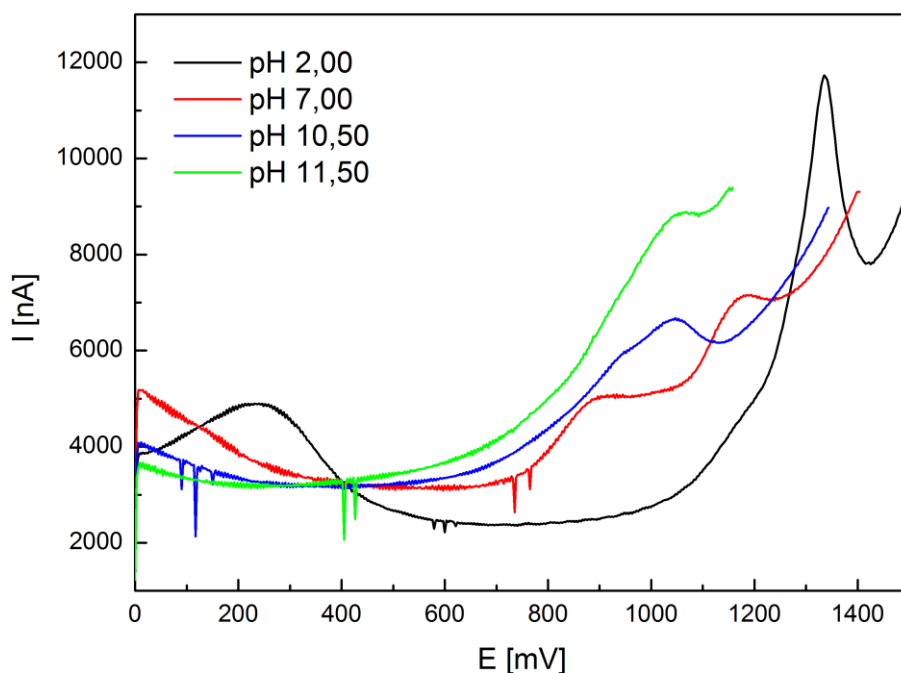
Obrázek 21 ukazuje logaritmickou závislost proudu druhého píku na skenovací rychlosti. Také v tomto případě se jedná o lineární závislost, jejíž směrnice vypovídají o řídicím ději. Pro děj řízený předřazenou kinetickou reakcí by směrnice měla mít hodnotu 0, pro difuzí řízený děj hodnotu 0,5 a pro reakci adsorbované látky hodnotu 1. V našem případě mají obě směrnice hodnotu větší než 0,5, což znamená, že děj je řízen převážně difuzí s mírným vlivem adsorpce. Dále je zřetelné, že s přidavkem acetonitrilu (obrázek 21B) dochází k poklesu hodnoty směrnice z hodnoty 0,6009 na hodnotu 0,5621, tudíž acetonitril způsobuje potlačení adsorpce. Tento jev byl pozorován i pro ostatní hodnoty pH.



Obrázek 21: Logaritmická závislost proudové odezvy druhého píku sildenafilu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) na logaritmu skenovací rychlosti, A - roztok bez přidavku acetonitrilu, B - roztok s 10 % (v/v) acetonitrilu

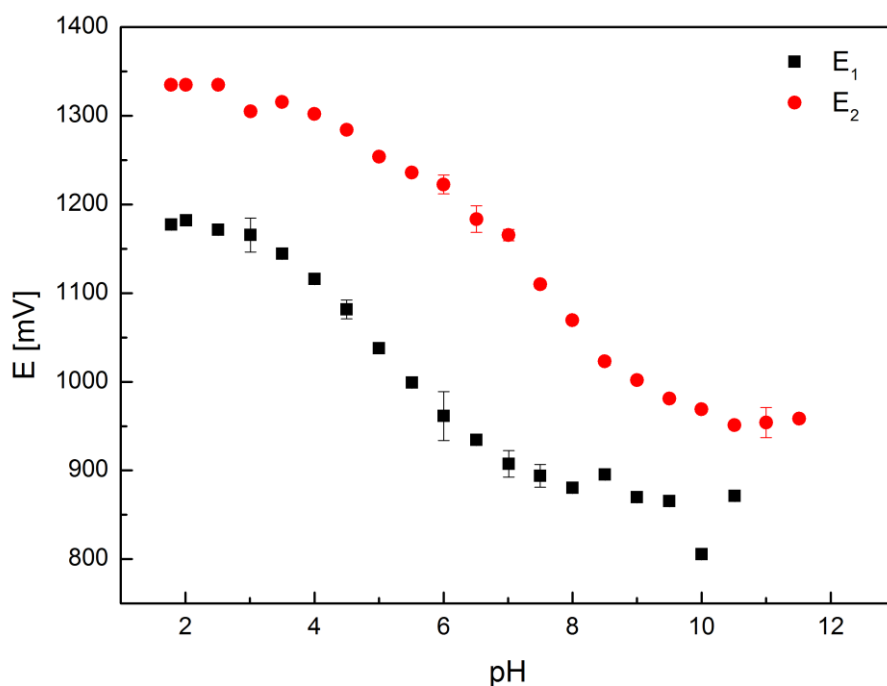
4.4 Závislost na pH

Podrobnější studium vlivu pH na proudovou odezvu sildenafilu bylo provedeno diferenčně pulzní voltametrií v sérii 22 Britton-Robinsonových pufrů v rozmezí pH 1,78 až 11,98 s přidavkem 10 % (v/v) acetonitrilu.



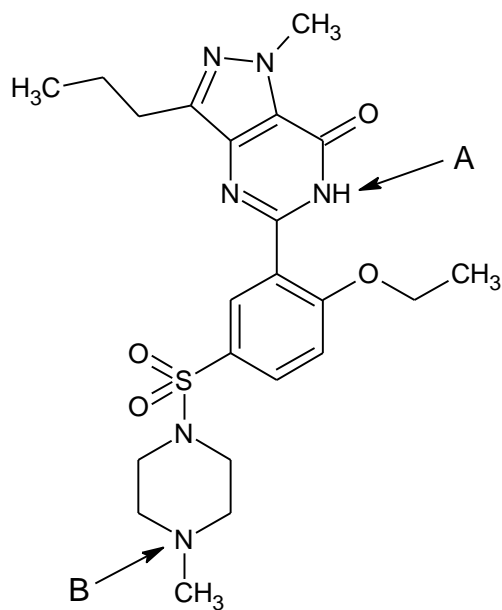
Obrázek 22: Diferenčně pulzní voltamogramy sildenafilu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) pro čtyři různé hodnoty pH Britton-Robinsonova pufru

Na obrázku 22 je zřetelné, že v kyselém prostředí (hodnota pH 2,00) je velmi výrazný druhý pík (u kladnějších hodnot potenciálu – cca 1350 mV), zatímco první pík u hodnot potenciálu cca 1200 mV je špatně rozlišený. Se zvyšující se hodnotou pH se oba píky posouvají směrem k nižším hodnotám potenciálu, což pozoroval i Zuman a kol. [13]. V neutrálním prostředí jsou pak velmi dobře pozorovatelné oba píky, které jsou navíc přibližně stejně vysoké. Při dalším zvyšování hodnoty pH dochází ke splývání obou píků v jeden, což je vidět na obrázku 22 při hodnotě pH 10,50 – modrá křivka a od hodnoty pH 11,50 je pozorovatelný už jen jeden pík.



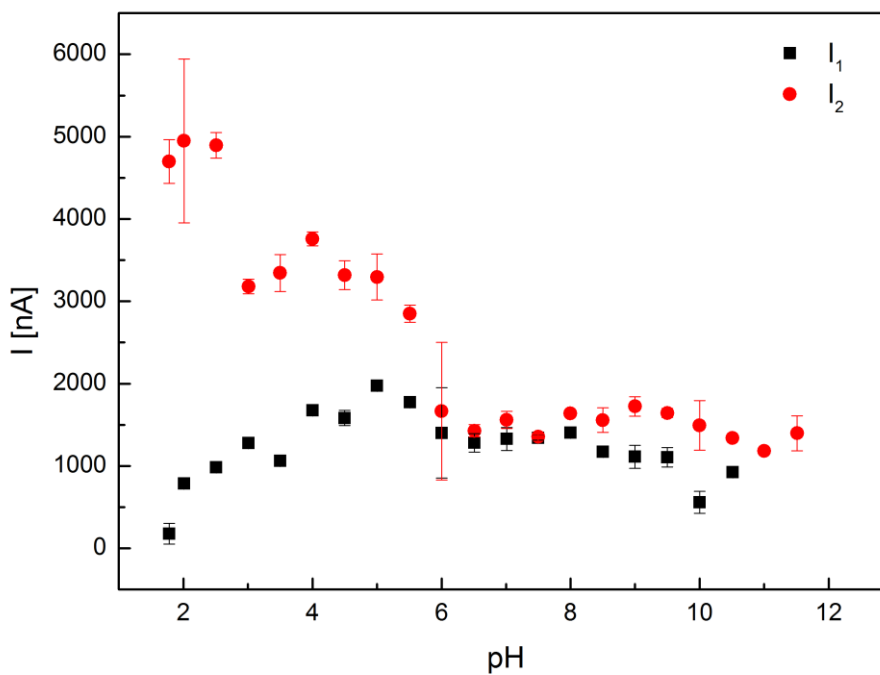
Obrázek 23: Závislost potenciálu prvního a druhého píku sildenafilu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) na pH Britton-Robinsonova pufru

Na obrázku 23 je blíže zobrazen právě posun potenciálů obou píků v závislosti na zvyšujícím se pH. Na křivce pro první pík je patrné zmenšení strmosti v okolí pH 7,00, na křivce pro druhý pík se výrazněji mění směrnice v alkalické oblasti kolem pH 9,50. Tyto změny trendu mohou souviset s disociací sildenafilu. Literatura [24-25] uvádí dvě hodnoty disociačních konstant, které se týkají dusíků v polohách označených na obrázku 24 jako A a B: $pK(A) = 9,12$ [24], resp. $10,30$ [25] a $pK(B) = 6,78$ [24], resp. $7,10$ [25].



Obrázek 24: Potenciální ionizační místa v molekule sildenafilu [24]

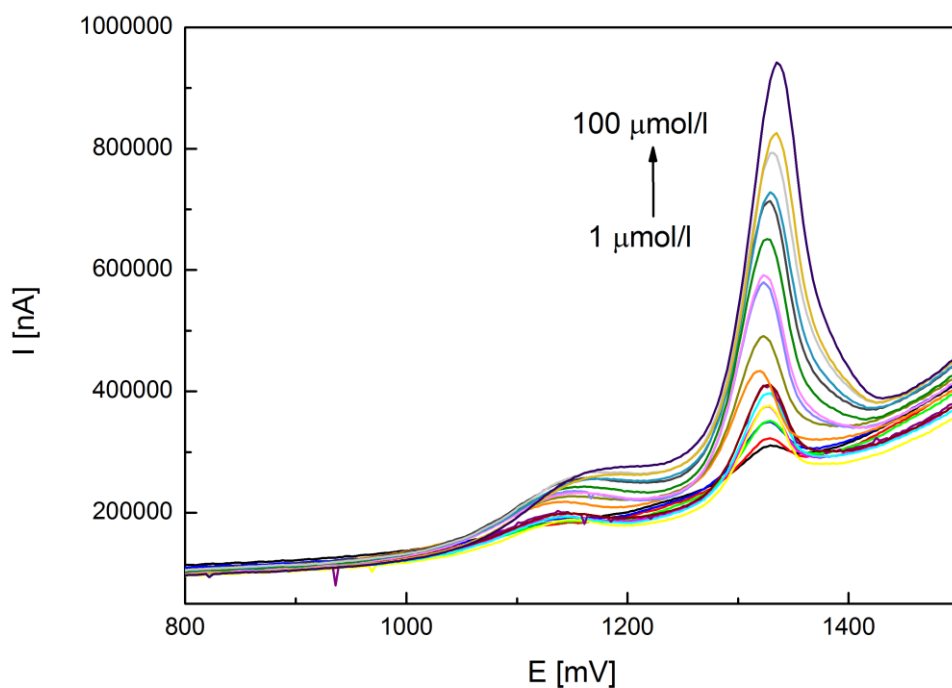
V případě proudové odezvy prvního píku nebyl pozorován žádný výrazný trend, avšak pro proudovou odezvu druhého píku byla pozorována klesající závislost s rostoucí hodnotou pH. Toto chování je ilustrováno na obrázku 25.



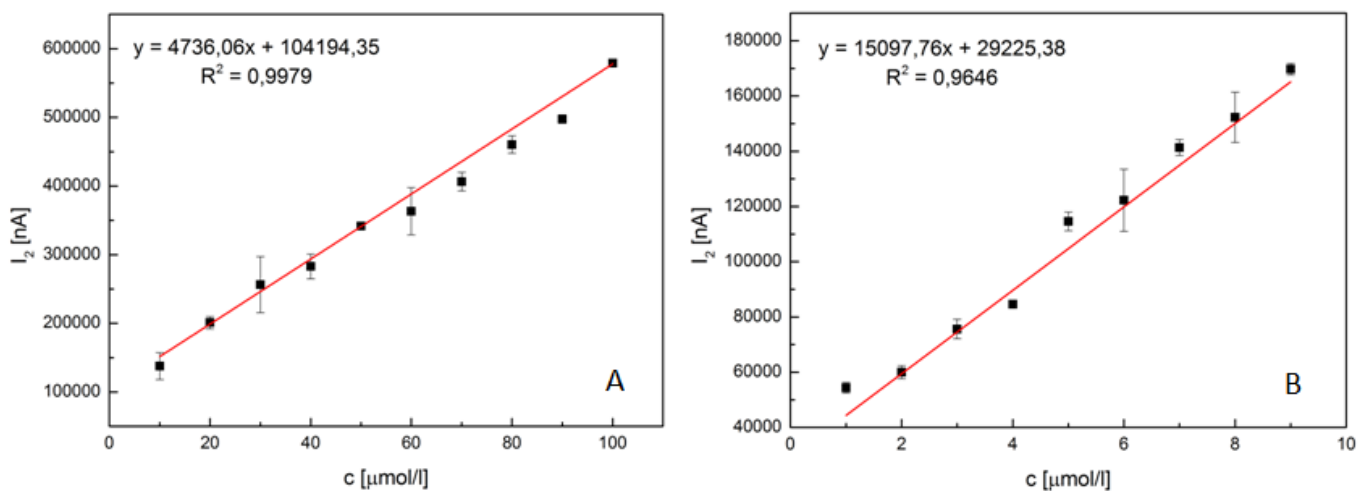
Obrázek 25: Závislost proudové odezvy obou píků sildenafilu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) na pH Britton-Robinsonova pufru

4.5 Kalibrace

Kalibrační závislost byla měřena pro pět různých hodnot pH (2,00 až 10,00) Britton-Robinsonova pufru. Roztoky sildenafilu v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l (1 až 100 $\mu\text{mol/l}$) obsahovaly 10 % (v/v) acetonitrilu. Na obrázku 26 jsou vykresleny křivky pro jednotlivé koncentrace sildenafilu v Britton-Robinsonově pufru o pH 2,00 a na obrázku 27 jsou sestrojeny kalibrační přímky z naměřených hodnot. Jak je vidět, jedná se v našem případě o lineární závislost proudové odezvy druhého píku na koncentraci sildenafilu. Zuman a spol. [13] popisují ve své práci, že závislost proudové odezvy druhého píku na koncentraci sildenafilu je nelineární, což podle nich svědčí o adsorpční povaze tohoto píku. Naopak pro první pík by podle těchto vědců měla platit lineární závislost na koncentraci sildenafilu. V našem případě však pro první pík platí linearita jen při nízkých hodnotách koncentrace a dále se jedná o závislost nelineární. Koeficient determinace (R^2) měl pro vyšší koncentrace sildenafilu hodnotu 0,9979 a pro nižší koncentrace sildenafilu 0,9646. Dále byla spočítána mez detekce a mez stanovitelnosti z parametrů lineární regresní přímky pro nižší koncentrace sildenafilu podle vztahu $3 \cdot \sigma/k$, kde σ je směrodatná odchylka úseku přímky a k je směrnice. V našem případě byla mez detekce 0,96 $\mu\text{mol/l}$. Mez stanovitelnosti, vypočítaná ze vztahu $10 \cdot \sigma/k$, kde σ je opět směrodatná odchylka úseku a k je směrnice přímky, činila 3,19 $\mu\text{mol/l}$.



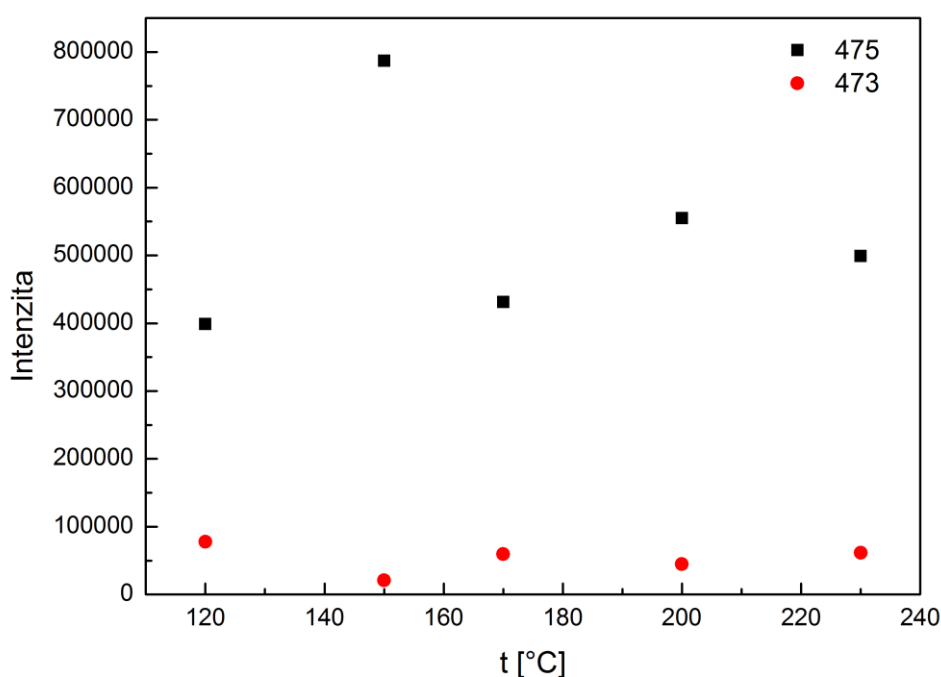
Obrázek 26: Diferenčně pulzní voltamogramy pro jednotlivé koncentrace sildenafilu ($c = 1 \mu\text{mol/l}$ – černá křivka až $100 \mu\text{mol/l}$ – tmavě fialová křivka) v Britton-Robinsonově pufru o pH 2,00



Obrázek 27: Kalibrační přímka, A – pro vyšší koncentrace sildenafilu ($c = 10$ až $100 \mu\text{mol/l}$) a B – pro nižší koncentrace sildenafilu ($c = 1$ až $9 \mu\text{mol/l}$)

4.6 EC-MS

Nejprve byl sledován vliv jednotlivých parametrů v iontovém zdroji, jako jsou teplota, rychlost průtoku a tlak sušícího plynu a napětí na kapiláře na velikost odezvy sildenafilu v kladném i záporném ionizačním módu. Vliv teploty v iontovém zdroji byl sledován v rozmezí 120 až 230 °C. Nejnižší teplota nejvíce vyhovovala zápornému módu při měření sildenafilu, neboť bylo dosaženo nejvyšší intenzity píku deprotonované molekuly $[M-H]^-$ s m/z 473. V kladném módu byla preferována spíše teplota 150 °C. Závislost intenzity píků na teplotě je znázorněna na obrázku 28.

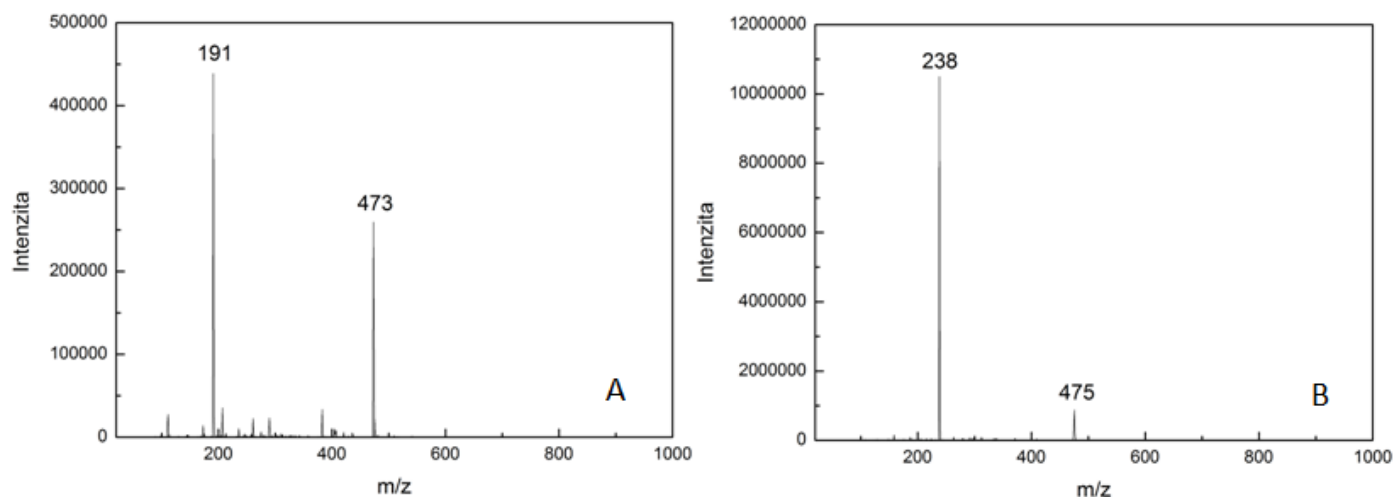


Obrázek 28: Závislost intenzity protonované molekuly $[M+H]^+$ s m/z 475 a deprotonované molekuly $[M-H]^-$ s m/z 473 na teplotě

Dalším sledovaným parametrem byl průtok a tlak sušícího plynu. Zatímco v záporném módu poskytoval pík s m/z 473 nejvyšší odezvu při relativně vysokém tlaku 15 psi a průtoku 7 l/min, v kladném módu bylo dosaženo nejvyšší odezvy pro pík m/z 475 při nízkém tlaku 7 psi a průtoku 2 l/min sušícího plynu. Proto byl nakonec zvolen kompromis pro oba módy, kde byl průtok nastaven na 3 l/min a tlak na 10 psi.

Posledním sledovaným parametrem pro optimalizaci metody bylo napětí vkládané na kapiláru. V záporném módu byl signál nejvyšší při napětí 2500 V a v kladném módu při 3000 V. Hmotnostní spektra sildenafilu citrátu získaná při

optimálních podmínkách shrnutých v tabulce 2 jsou na obrázku 29. V záporném ionizačním módu jsou vidět signály deprotonovaných molekul sildenafilu $[M-H]^-$ s m/z 473 a citronové kyseliny s m/z 191, v kladném módu je zřetelný signál protonované molekuly sildenafilu $[M+H]^+$ s m/z 475 a základní pík s m/z 238 příslušející dvakrát protonované molekule $[M+2H]^{2+}$.



Obrázek 29: Hmotnostní spektra sildenafilu citrátu ($c = 5 \cdot 10^{-4}$ mol/l) zaznamenaná A – v záporném módu a B – v kladném módu ESI za optimálních podmínek uvedených v tabulce 2

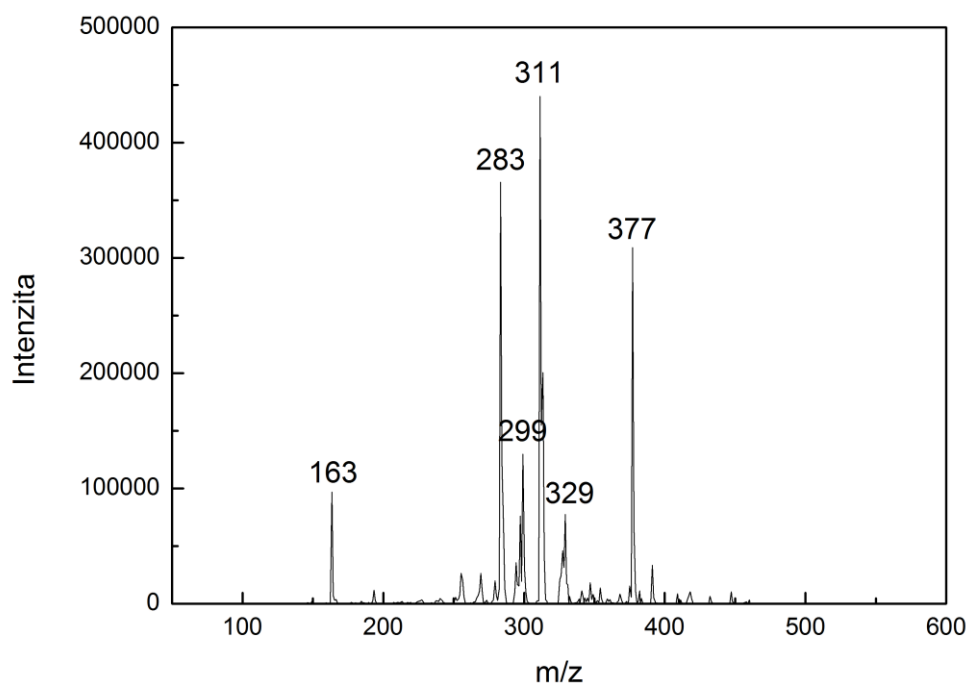
Parametr	Záporný mód	Kladný mód
Teplota	120 °C	
Průtok a tlak sušícího plynu	3 l/ min 10 psi	
Napětí na kapiláře	2500 V	3000 V

Tabulka 2: Optimální nastavení parametrů iontového zdroje ESI

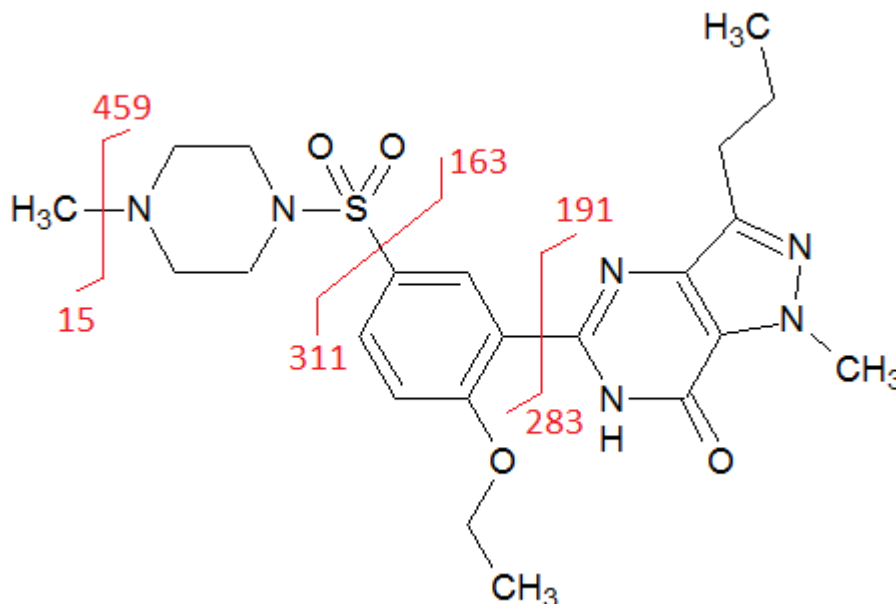
Po zjištění a nastavení optimálních parametrů byla sledována fragmentace sildenafilu, aniž by zatím probíhala elektrochemická oxidace. Fragmentace byla provedena jak v kladném, tak v záporném módu. Produktové spektrum pro kladný mód ESI je zachyceno na obrázku 30 a schéma štěpení molekuly sildenafilu je znázorněno na obrázku 31.

Při fragmentaci protonované molekuly sildenafilu s m/z 475 vznikají ionty s m/z 163; 283; 299; 311; 329 a 377, jak je vidět na obrázku 30. Toto fragmentační spektrum dobře koresponduje s literaturou [26-27]. Struktury fragmentů s m/z 163; 283 a 311 lze

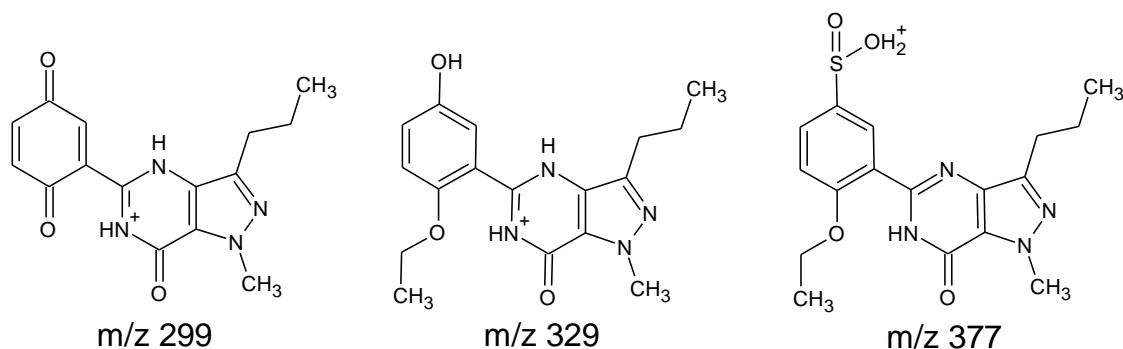
pozorovat na obrázku 31. Struktury ostatních vznikajících produktů jsou znázorněny na obrázku 32.



Obrázek 30: Fragmentační spektrum protonované molekuly $[M+H]^+$ s m/z 475



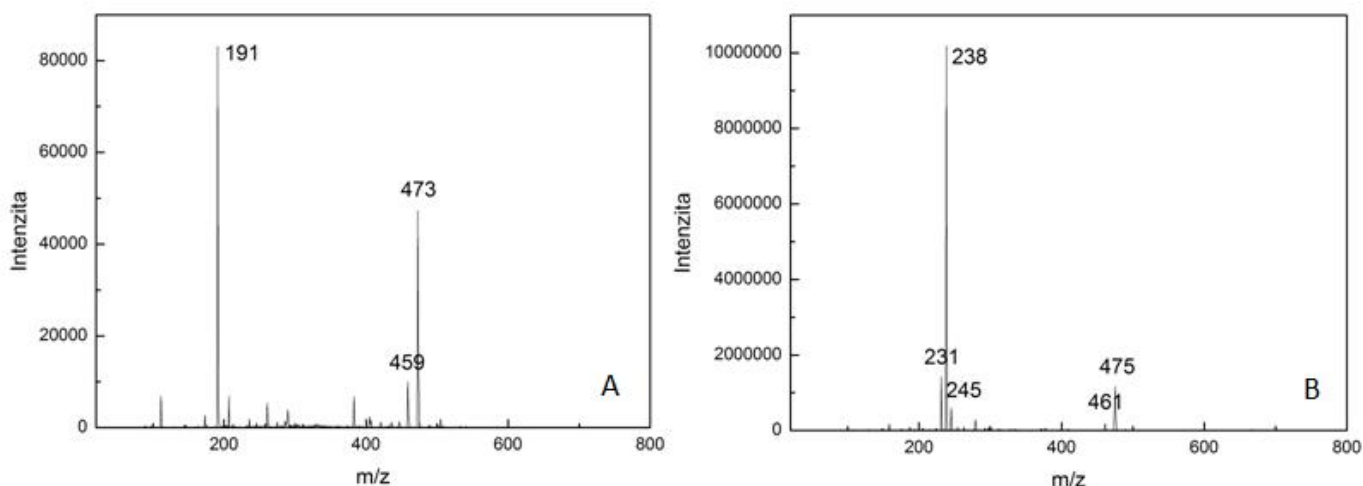
Obrázek 31: Schéma štěpení molekuly sildenafilu



Obrázek 32: Struktury sloučenin vznikajících při fragmentaci protonované molekuly s m/z 475 [26-27]

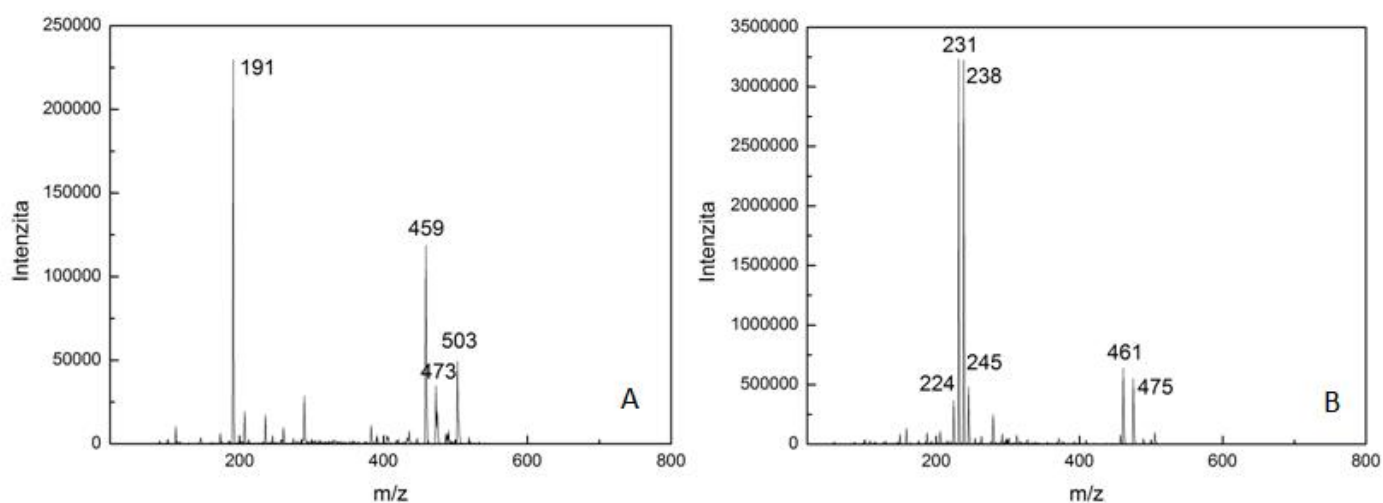
Pro studium elektrochemické oxidace sildenafilu byla k hmotnostnímu spektrometru připojena elektrochemická cela. Průtok měřeného roztoku byl nastaven na 4 $\mu\text{l}/\text{min}$. K coulometrické cele byl připojen potenciostat, na kterém byl nastavován polarizační potenciál pro elektrochemickou oxidaci. Hodnota potenciálu byla postupně zvyšována z 0 V po krocích 0,1 V do 0,3 V a následně v krocích 0,05 V až do hodnoty 1 V.

Při zvyšování polarizačního potenciálu z 0 V do cca 0,75 V nedocházelo k žádným výraznějším změnám ve spektrech. Až při potenciálu 0,8 V lze pozorovat vznik nových píků, což je vidět na obrázku 33. Pro záporný mód se začíná objevovat pík s hodnotou m/z 459 odpovídající deprotonované molekule N-desmethylsildenafilu, který vzniká oxidativním odštěpením methylové skupiny z piperazinového kruhu sildenafilu, což lze vidět na obrázku 31. V kladném módu lze pozorovat pík protonované molekuly N-desmethylsildenafilu s m/z 461. Fragmentová spektra izolovaných iontů m/z 459 a 461 odpovídají spektrům publikovaným v literatuře [26]. Dále nově vznikají píky s m/z 231 a 245, které jsou pozorovatelné v kladném módu. Pík s m/z 231 pravděpodobně odpovídá dvakrát protonované molekule N-desmethylsildenafilu. Pík s m/z 245 nebyl blíže identifikován.



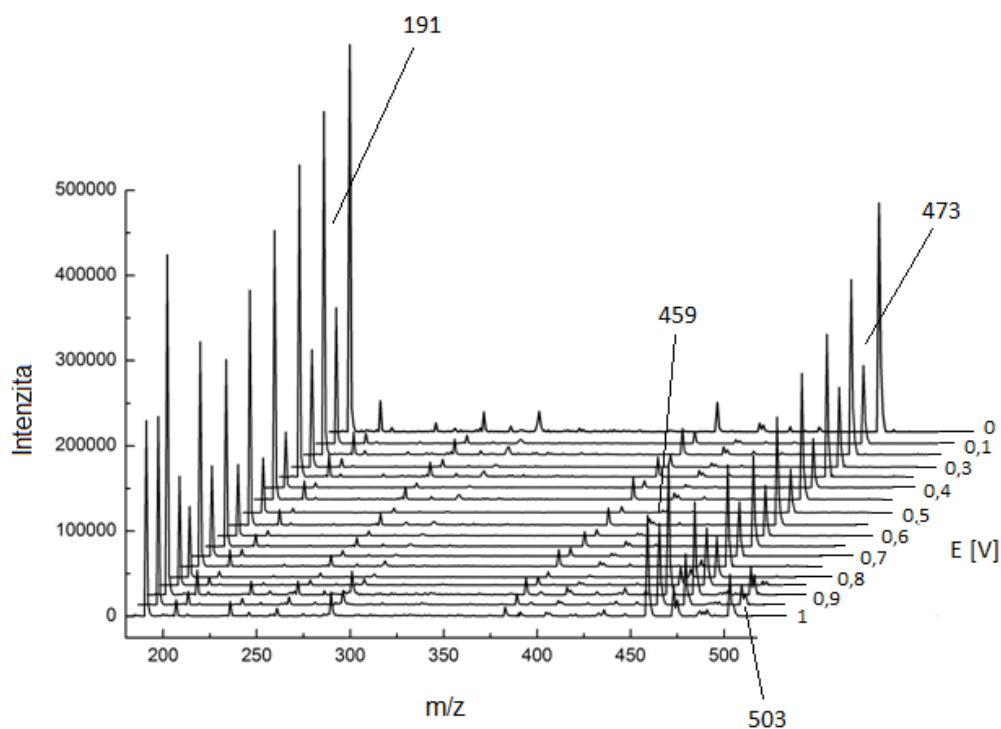
Obrázek 33: Hmotnostní spektra sildenafilu citrátu ($c = 5 \cdot 10^{-4}$ mol/l) zaznamenaná A – v záporném módu a B – v kladném módu ESI při polarizačním potenciálu 0,8 V

S dalším zvyšováním polarizačního potenciálu docházelo k postupnému nárůstu výše zmíněných vznikajících píků, avšak nebyly pozorovány píky s jiným m/z než 459 pro záporný mód či s m/z 461, 231 a 245 pro kladný mód. Až při nastavení hodnoty polarizačního potenciálu na 1 V se objevil v záporném módu pík s m/z 503, což je pozorovatelné na obrázku 34. V kladném módu byl pozorován pík s m/z 505 s velmi malou intenzitou. Tento pík by mohl odpovídat produktu vzniklému navázáním dvou atomů kyslíku. Tomu odpovídá i fragmentové spektrum izolovaného iontu s m/z 503, kde jsou intenzivní píky s m/z 475 a 447, které odpovídají postupnému odštěpení dvou neutrálních molekul CO. Lze tedy předpokládat, že atomy kyslíku se navázaly na atomy uhlíku. V kladném módu došlo k nárůstu píku s m/z 231 do takové míry, že překonal svou intenzitou dosud dominující pík s m/z 238. Dále se nově vyskytl pík s m/z 224, který nebyl blíže identifikován.

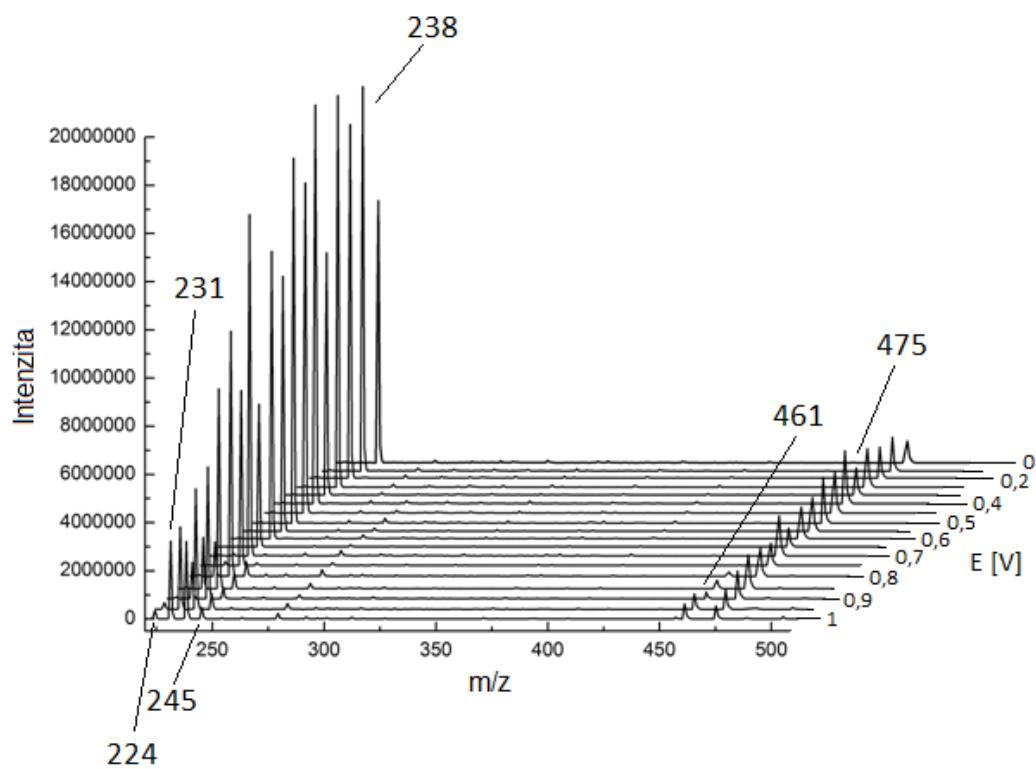


Obrázek 34: Hmotnostní spektra sildenafilu citrátu ($c = 5 \cdot 10^{-4}$ mol/l) zaznamenaná A – v záporném módu a B – v kladném módu ESI při polarizačním potenciálu 1 V

Záznam hmotnostních spekter sildenafilu citrátu zaznamenaných při různých hodnotách polarizačního potenciálu jsou zachycena na obrázku 35 – záporný mód ESI a na obrázku 36 – kladný mód ESI.



Obrázek 35: Hmotnostní spektra sildenafilu citrátu ($c = 5 \cdot 10^{-4}$ mol/l) zaznamenaná v záporném módu ESI při polarizačních potenciálech 0 až 1 V



Obrázek 36: Hmotnostní spektra sildenafilu citrátu ($c = 5 \cdot 10^{-4}$ mol/l) zaznamenaná v kladném módu ESI při polarizačních potenciálech 0 až 1 V

5 Závěr

Cílem této práce bylo sledování elektrochemické oxidace sildenafilu za použití voltametrických technik, konkrétně cyklické voltametrie a diferenčně pulzní voltametrie. Byly pozorovány dva píky v anodickém směru polarizace, a to při potenciálech 1,2 a 1,35 V. Při sledování závislosti na rychlosti polarizace elektrody bylo ze směrnic logaritmických přímek zjištěno, že pro oba píky je řídicím dějem difuze, u druhého píku s malým příspěvkem adsorpce. To bylo dále potvrzeno lineární závislostí proudové odezvy obou píků na odmocnině z rychlosti skenu. Pro potlačení negativního vlivu adsorpce byl zvolen přídatek acetonitrilu, který činil 10 % (v/v). Při bližším zkoumání vlivu pH na polohu a výšku píků bylo zjištěno, že se zvyšující se hodnotou pH dochází k posunu obou píků k méně kladným hodnotám potenciálu. To znamená, že elektrochemickou reakci doprovází odštěpení protonů. Při zvyšování pH také docházelo k poklesu proudové odezvy v případě druhého píku. Proto byla zvolena kyselá oblast pH jako optimální pro měření kalibračních závislostí. Mez detekce určená metodou diferenčně pulzní voltametrie byla 0,96 $\mu\text{mol/l}$ a mez stanovitelnosti byla 3,19 $\mu\text{mol/l}$. Kyselé prostředí bylo zvoleno také pro studium elektrochemické oxidace sildenafilu v on-line spojení s hmotnostní spektrometrií. Bylo zjištěno, že při elektrochemické oxidaci této látky dochází podobně jako v živých organismech ke vzniku N-desmethylsildenafilu jako hlavního oxidačního produktu.

6 Summary

The aim of this work was to study the electrochemical oxidation of sildenafil citrate by electrochemical techniques: cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry. Two irreversible anodic current signals at potentials 1.2 and 1.35 V vs. Ag/AgCl were observed in the differential pulse voltammograms in buffered solution of pH 2.00. Potential as well as current of the peaks was pH dependent. The peak potential was shifted to the less positive values with increasing pH in the range of pH 3.00 to 10.00 indicating participation of protons in the electrode reactions. The highest current intensity was observed at more positive peak in strongly acidic solutions (around pH 2.00). Dependence of peak current on scan rate in cyclic voltammetry experiments revealed that current of both anodic peaks is diffusion controlled with moderate influence of adsorption in case of the more positive peak. Addition of 10 % (v/v) of acetonitrile was used to suppress partially the negative effect of adsorption. Calibration dependences measured at pH 2.00 were linear in the concentration range 1 to 100 $\mu\text{mol/l}$. The limits of detection and quantification were 0.96 $\mu\text{mol/l}$ and 3.19 $\mu\text{mol/l}$, respectively. Electrochemical oxidation of sildenafil in acidic media was studied by on-line coupling of electrochemistry with mass spectrometry. N-desmethylsildenafil was identified as the main oxidation product.

7 Literatura

- [1] P. J. Dunn, D. J. Dale, C. Golightly, M. L. Hughes, P. C. Levett et al. The Chemical Development of the Commercial Route to Sildenafil: A Case History. *Organic Process Research & Development*, 4 (2000), 17-22.
- [2] R. A. Farghali a R. A. Ahmed. A Novel Electrochemical sensor for Determination of Sildenafil Citrate (Viagra) in Pure Form and in Biological and Pharmaceutical Formulations. *International Journal of Electrochemical Science*, 7 (2012), 13008-13019.
- [3] D. K. Walter, M. J. Ackland, G. C. James, G. J. Muirhead, D. J. Rance et al. Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. *Xenobiotica*, 29 (1999), 297-310
- [4] J. J. Li, D. S. Johnson, D. R. Sliskovic a B. D. Roth. *Contemporary Drug Synthesis*. JOHN WILEY & SONS, (2004).
- [5] A. M. Y. Jaber, N. Daraghmeh, M. M. Al-Omari a A. A. Badwan. Determinaton of sildenafil citrate and related substances in the commercial products and tablet dosage form using HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25 (2001), 483-492.
- [6] M. Al-Ghazawi, M. Tutunji a S. AbuRuz. Simultaneous determination of sildenafil and *N*-desmethyl sildenafil in human plasma by high-performance liquid chromatography method using electrochemical detection with application to a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43 (2007), 613-618.
- [7] S. M. van Leeuwen, B. Blankert, J.-M. Kauffmann a U. Karst. Prediction of clozapine metabolism by on-line electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 382 (2005), 742-750.
- [8] J. Raba, F. A. Bertolino, I. E. De Vito, G. A. Messina a H. Fernández. Microfluidic-enzymatic biosensor with immobilized tyrosinase for electrochemical detection of pipemidic acid in pharmaceutical samples. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 651 (2011), 204-210.
- [9] K. P. Lee, A. I. Gopalan a S. Komathi. Strategically functionalized carbon nanotubes as the ultrasensitive electrochemical probe for picomolar detection of sildenafil citrate (Viagra). *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2011), 3018–3022.

- [10] A. M. Khalid, S. Rauf, H. Nawaz, K. Akhtar a M. A. Ghauri. Studies on sildenafil citrate (Viagra) interaction with DNA using electrochemical DNA biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007), 2471-2477.
- [11] S. Yilmaz. Adsorptive stripping voltammetric determination of zopiclone in tablet dosage forms and human urine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71 (2009), 79-83.
- [12] S. A. Özkan, B. Uslu, D. Kul a M. Gumustas. Electroanalytical characteristics of antipsychotic drug ziprasidone and its determination in pharmaceuticals and serum samples on solid electrodes. *Talanta*, 82 (2010), 286-295.
- [13] S. A. Özkan a B. Uslu, P. Zuman. Electrochemical oxidation of sildenafil citrate (Viagra) on carbon electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 501 (2004), 227-233.
- [14] S. A. Özkan a B. Uslu, H. Y. Aboul-Enein a R. Dogan. Electrochemical behavior of vardenafil on glassy carbon electrode: Determination in tablets and human serum. *Analytica Chimica Acta*, 552 (2005), 127-134.
- [15] K. Tyszczyk a M. Korolczyk. Voltammetric method for the determination of sildenafil citrate (Viagra) in pure form and in pharmaceutical formulations. *Bioelectrochemistry*, 78 (2010), 113-117.
- [16] J. Skopalová, J. Táborský, M. Švidrnoch, O. Kurka, L. Borovcová, P. Bednář a P. Barták. Electrochemical oxidation of zopiclone. *Monatsh Chem*, 147 (2016), 53-60.
- [17] J. Wang. *Analytical Electrochemistry*. 3rd edition, Wiley & Sons, (2006).
- [18] P. T. Kissinger, W. R. Heineman. Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 702-706.
- [19] F. Scholz. *Electroanalytical Methods*. 2nd edition, Springer, (2010).
- [20] U. Karst, H. Faber a M. Vogel. Electrochemistry/mass spectrometry as a tool in metabolism studies – A review. *Analytica Chimica Acta*, 834 (2014), 9–21.
- [21] E. de Hoffmann a V. Stroobant, *Mass Spectrometry*, 3rd edition, Wiley & Sons, (2007).
- [22] B. N. Pramanik, A. K. Ganguli a M. L. Gross, *Applied Electrospray Mass Spectrometry*, Marcel Dekker, (2002).
- [23] J. Cazes, *Analytical Instrumentation Handbook*, 3rd edition, Marcel Dekker, (2005).

- [24] H. H. Girault, V. Gobry, G. Bouchard, P.-A. Carrupt a B. Testa. Physicochemical characterization of sildenafil: ionization, lipophilicity behavior, and ionic-partition diagram studied by two-phase titration and electrochemistry. *Helvetica Chimica Acta*, 83 (2000), 1465–1474.
- [25] M. M. Al-Omari, M. B. Zughul, J. E. D. Davies a A. A. Badwan. Sildenafil/cyclodextrin complexation: Stability constants, thermodynamics, and guest–host interactions probed by ¹H NMR and molecular modeling studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41 (2006), 857–865.
- [26] D. Zhong, J. Xing, S. Zhang a L. Sun. Study of the electrospray ionization tandem mass spectrometry of sildenafil derivatives. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16 (2002), 1836-1843.
- [27] Wilfried M. A. Niessen a Ricardo A. Correa C. *Interpretation of MS-MS Mass Spectra of Drug and Pesticides*, 1st edition, Wiley & Sons, (2017)
- [28] S. Chowdhury. *Identification and Quantification of Drugs, Metabolites and Metabolizing Enzymes by LC-MS*. 1st edition, Elsevier, (2005)