UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Využití elektrochemických metod pro studium redoxních vlastností a analýzu léčiv – studium elektrochemické oxidace zopiklonu

Rigorózní práce

Autor práce:	Mgr. Jakub Táborský
Studijní obor:	Analytická chemie
Konzultant:	RNDr. Jana Skopalová, PhD.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne…….

…….....

Jakub Táborský

Rád bych poděkoval celému kolektivu laboratoře elektroanalytických technik, především Dr. Janě Skopalové, PhD., dále doc. Petru Bartákovi, PhD. za četné rady a připomínky při tvorbě práce a také doc. Petru Bednářovi, PhD. za pomoc při zpracování hmotnostních spekter. Velké poděkování patří mé manželce za neutuchající podporu při mém studiu a práci.

Souhrn

Předkládaná práce se zabývá elektrochemickým chováním a elektrochemickou přeměnou léčiva zopiklon. Toto léčivo se používá ke krátkodobé léčbě nespavosti a u nás je dostupné na předpis pod názvem Zopitin.

Ke sledování elektrochemických vlastností byly použity cyklická voltametrie (CV), diferenčně pulzní voltametrie (DPV), lineární voltametrie (LSV) na statické a rotační diskové elektrodě ze skelného uhlíku. Voltamogramy zopiklonu poskytují jeden ireversibilní anodický pík. Oxidace zopiklonu je závislá na pH v kyselém prostředí a je ovlivněna adsorpčními a kinetickými ději.

Zopiklon byl pomocí elektrolýzy za konstantního potenciálu elektrochemicky oxidován, a to v off-line a on-line zapojení při různých potenciálech zvolených dle voltametrické odezvy. Produkty elektrolýzy byly poté analyzovány hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem. Analýzou elektrolyzovaných vzorků byly nalezeny oxidační produkty *N*-demethylovaný zopiklon a další tři oxidační produkty, které vznikly adicí jednoho nebo dvou atomů kyslíku. Na základě naměřených spekter bylo prokázáno, že jako centrum oxidace je piperazinový kruh.

Summary

An electrochemical behaviour of zopiclone has been studied. The drug is indicated for the short - term treatment of insomnia and is commercially available under the name Zopitin.

Voltammetric study was performed using cyclic, differential pulse, linear sweep and differential pulse adsorptive stripping voltammetry on glassy carbon electrode in static and rotation disc arrangement. The oxidation of zopiclone is pH dependent at acidic. Electrochemical reaction is strongly influenced by adsorption and kinetic phenomena.

Controlled potential electrolysis in offline and on-line combination with tandem mass spectrometry was employed for investigation of the zopiclone oxidation products.

Four oxidation products were found in electrolyzed samples, *N*-desmethyl zopiclone and other three products. Based on mass spectrometric investigation of those products, piperazine moiety was proved as a target of electrochemical oxidation of zopiclone.

Obsah

Souhrn **4**

Summary **5**

Obsah **6**

1. Úvod **8**

2. Zopiklon **9**

2.1. Mechanismus účinku 10

2.2. Farmakokinetika 11

2.3. Metabolické přeměny zopiklonu 12

2.4. Stanovení zopiklonu 12

2.5. Elektrochemické vlastnosti 13

3. Elektrochemická analýza a stanovení léčiv **14**

3.1. Studium redoxních vlastností látek 15

3.1.1. Analýza léčiv na různých typech elektrod 17

3.1.2. Analýza léčiv na rtuťových elektrodách 17

3.1.3. Analýza léčiv na pevných elektrodách 19

3.1.4. Analýza léčiv na modifikovaných elektrodách 21

3.2. Elektrochemie látek obsahující piperazinový kruh 23

3.2.1. Clozapin 23

3.2.2. Imatinib 24

4. Elektrochemie spojená s hmotnostní spektrometrií **25**

4.1. Studium mechanismu elektrochemických reakci spojením EC – (HPLC)/MS 28

4.2. On-line elektrochemická derivatizace a úprava vzorků 29

4.3. Vývoj léčiv a oxidativní metabolismus 30

4.3.1. Oxidace látek obsahující dusíkový atom 32

5. Experimentální část **33**

5.1. Chemikálie 33

5.2. Přístrojové vybavení 33

5.3. Pracovní postupy 34

5.3.1. Voltametrické experimenty 34

5.3.2. Elektrolýza za konstantního potenciálu 35
5.3.3. On-line spojení EC/MS 35
6. Výsledky a diskuze 35
6.1. Elektrochemické chování zopiklonu 35
6.2. Závislost na pH 37
6.3. Závislost na rychlosti skenu 38
6.4. Vliv adsorpce 41
6.5. Závislost na koncentraci ZOP 42
6.6. MS analýza zopiclonu a jeho oxidačních produktů 42
7. Závěr 50
8. Použitá literatura 52

1. Úvod

Jednou z hlavních výzev ve farmaceutickém průmyslu je určení metabolické přeměny léčebných kandidátů. Hlavním způsobem, jakým je léčivo eliminováno v lidském těle, je enzymatická biotransformace. Ta probíhá zejména oxidativní reakcí, která je katalyzována enzymy cytochromu P450. Se stále zvyšujícím se počtem nových chemických látek je zapotřebí rychlých screeningových technik, které by jednoduše poskytly informace o biotransformaci těchto nových látek. Čím dříve jsou tyto testy provedeny, tím dříve může být nevhodná látka vyloučena z vývoje.

Elektrochemie je u nás úzce spjata se jménem Jaroslava Heyrovského, který za objev polarografie obdržel v roce 1959 Nobelovu cenu za chemii. Jeho objev významně přispěl k rozvoji elektrochemie. Elektrochemicky mohou být napodobeny určité procesy, které probíhají v živých organismech. Například můžeme konkrétní léčivo podrobit elektrochemické oxidaci, elektrolýze za stálého potenciálu a poté analyzovat produkty, které při oxidaci vznikly. Tyto produkty lze separovat, zpravidla chromatograficky a detekovat hmotnostním spektrometrem.

Tato práce ukazuje možnost využití spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií. V průběhu poslední let se dramaticky zvýšil rozsah a aplikace elektrochemických metod a jejich spojení, ať už on-line či off-line, s hmotnostní spektrometrií. Toto spojení je dnes využíváno v mnoha oblastech, např. pro metabolické studie, analýzu peptidů, proteinů a DNA, kvantifikaci biomolekul nebo předúpravě vzorků.

Cílem této práce je charakterizovat elektrochemické chování zopiklonu a analyzovat produkty jeho elektrochemické oxidace.

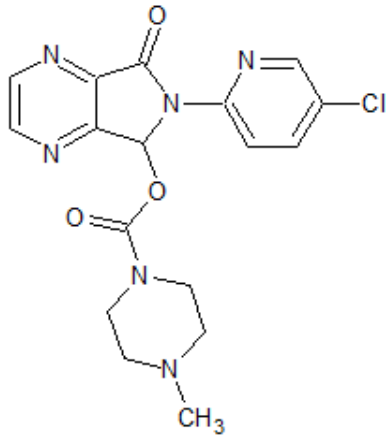
2. Zopiklon

Mezi mnohými hypnotickými léčivy, která se používají při léčbě nespavosti, jsou nejvíce používané benzodiazepiny. Největším problémem v užívání benzodiazepinu je možnost vzniku závislosti na jeho užívání. Další důležitou třídou léčiv, používaných v léčbě nespavosti, jsou látky známé jako Z-léčiva (Z-drugs). Názvy většiny těchto léčiv začínají písmenem Z, proto Z-drugs. Mezi Z-drugs se řadí zaleplon, zolpidem a zopiklon.

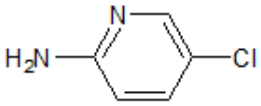
Zopiklon (ZOP) (obrázek 1) je chemicky (*RS*)-6-(5-chloropyridin-2-yl)-7-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrrolo[3,4-b]pyrazin-5-yl 4-methylpiperazin-1-karboxylát. Jeho sumární vzorec je $C_{17}H_{17}ClN_6O_3$ a molární hmotnost 388,808 g/mol. ZOP je nebenzodiazepinové hypnotické léčivo z třídy cyklopyrrolonů určené ke krátkodobé léčbě nespavosti. Působí jako sedativum, anxiolytikum, způsobuje uvolnění svalů a má amnestické a antikonvulzivní účinky. ZOP je chirální léčivo podávané jako racemická směs, nicméně farmakologická aktivita je připisována hlavně (+)-(*S*)-ZOP enantiomeru, který se nazývá eszopiklon [1-3].

Zopiklon je u nás komerčně dostupný v lékovém přípravku Zopitin. V Kanadě, Austrálii, Švédsku, Finsku, Norsku a Rusku se prodává pod názvem Imovane, ve zbytku Evropy poté pod názvem Zimovane. V USA není komerčně dostupný, dá se pořídit jeho aktivní stereoisomerní forma eszopiklon, a to pod názvem Lunesta. Obsah ZOP v tabletách se pohybuje v rozmezí 3,75 mg, 5 mg nebo 7,5 mg.

Je známo, že cyklopyrrolony jsou poměrně nestabilní. Stabilita ZOP byla studována v několika publikacích [4-6]. Jako degradační produkt ZOP byl identifikován 2-amino-5-chlorpyridin (ACP, obrázek 2). Degradace ZOP (schéma 1) probíhá přes otevření pyrrolidinového kruhu a vzniklý meziprodukt je hydrolyzován na ACP. Degradace ZOP se odehrává v zásaditém prostředí pH 8 a vyšší [7]. Toxické vlastnosti ACP nebyly ještě důkladně prostudovány. Bylo již ale publikováno, že při požití, inhalování nebo při absorpci kůží je škodlivý. Může způsobit podráždění dýchacích cest, kůže a očí [7].



Obr. 1. Zopiklon



Obr. 2. 2-amino-5-chloropyridin

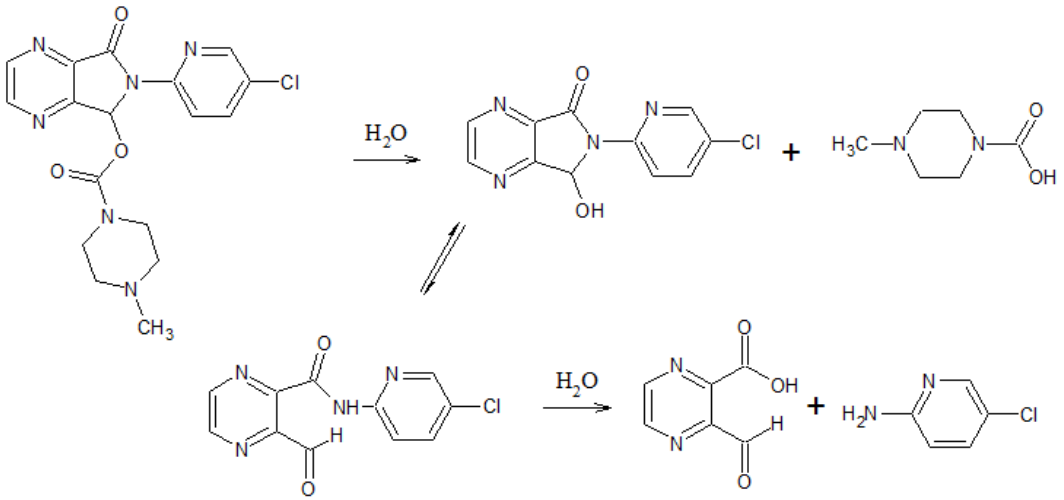


Schéma 1. Hydrolýzazopiklonu

2.1.Mechanismus účinku

Syntetická léčiva, nejprve barbituráty a poté benzodiazepiny, která se používají k léčbě nespavosti, využívají stejné mechanismy působení. Na tento fakt se přišlo až ke konci sedmdesátých let minulého století. Léčiva užívaná proti nespavosti zesilují aktivaci membránové vodivosti chloridových iontů díky inhibitoru neurotransmiteru γ-aminomáselné kyselině (GABA). Identifikace $GABA_A$ receptoru, jako společného cíle léčiv proti nespavosti,

stimulovala vývoj nových léčiv. Prvním z nich bylo léčivo z třídy cyklopyrrolonů zopiklon, následovaný zolpidemem. Všechna komerčně používaná hypnotika reagují s $GABA_A$ receptory. Každá třída léčiv má určité zvláštnosti v interakci s receptorem, které mohou mít důsledky pro jejich efektivitu či vedlejší účinky.

$GABA_A$ receptor je ionotropní receptor a iontový chloridový kanál v cytoplazmatické membráně neuronů. Jeho endogenním ligandem je γ-aminomáselná kyselina (GABA), která je hlavním inhibičním neurotransmiter v centrální nervové soustavě. $GABA_A$ receptor selektivně propouští chloridové ionty, což vede k hyperpolarizaci membrány neuronů.

ZOP a další cyklopyrrolony se vážou na místo v blízkosti vazebného místa benzodiazepinu na $GABA_A$ receptoru. Efekt ZOP na funkci $GABA_A$ receptoru spočívá v upřednostnění otevření kanálku. Cyklopyrrolony se vážou na $GABA_A$ v jiné alosterické modifikaci než benzodiazepiny. Reakce ZOP s $GABA_A$ je nezávislá na teplotě. To naznačuje, že interakce je termodynamicky řízena entropií na rozdíl od benzodiazepinů, jejichž reakce je teplotně závislá a tudíž řízená entalpií [8].

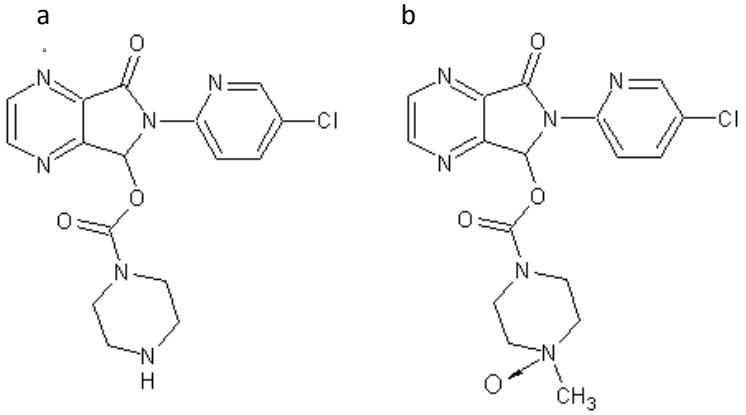
Zopiklon tedy působí na $GABA_A$ receptor, který funguje jako chloridový kanál v biomembráně neuronů. Navázání zopiklonu způsobí otevření tohoto kanálu a dojde k hyperpolarizaci biomembrány a inhibici funkce neuronů. To má za následek útlum organismu[8].

2.2. Farmakokinetika

Po orální administraci je zopiklon rychle absorbován. Jeho biodostupnost je přibližně 80 %. Vazba na proteiny v krevní plasmě se udává od 45 % do 80 %. ZOP je rychle distribuován do tělních tkání, včetně mozku a je vylučován močí, slinami a mateřským mlékem. ZOP je částečně metabolizován v játrech na neaktivní *N*-demethylovaný derivát a aktivní *N*-oxid. Asi 50 % ZOP je dekarboxylováno a vyloučeno plícemi. Zopiklon byl v moči nalezen v rozmezí 7 – 10 % z původní podané dávky. Farmakokinetika zopiklonu je stereoselektivní. Po užití racemické směsi zopiklonu, je maximální koncentrace *R*-formy v plazmě dosaženo později a také plocha pod křivkou závislosti koncentrace *R*-formy v plazmě na čase je větší v porovnání s *S*-formou. To ukazuje pomalejší odbourávání a menší distribuční objem *R*-formy léčiva. Koncentrace pravotočivých izomerů *N*-demethyl a *N*-oxid metabolitů v moči je vyšší než koncentrace *S*-forem těchto metabolitů [9,10].

2.3.Metabolické přeměny zopiklonu

Jak již bylo zmíněno, zopiklon je metabolizován na dva hlavní metabolity, *N*-demethylovaný (obrázek 3a) a *N*-oxid (obrázek 3b). *N*-oxid zopiklonu má malou farmakologickou aktivitu, *N*-demethylovaný metabolit je farmakologicky neaktivní. ZOP je metabolizován oxidativní biotransformací enzymy cytochromu P450, konkrétně enzymem CYP3A4. Při tvorbě *N*-demethylovaného metabolitu je částečně aktivní také enzym CYP2C8 [11]**.**



Obr. 3. Metabolity zopiklonu a) *N*-demethylovanýzopiklon, b) *N*-oxid zopiklonu**[8]**

2.4.Stanovení zopiklonu

Dle britských norem se ZOP stanovuje titračně v nevodném prostředí s potenciometrickou detekcí [7]. Analýza ZOP v tabletách je prováděna metodou HPLC [1,7,12-14]**.** Další způsoby detekce ZOP zahrnují spektrofotometrii [12], HPLC, GC [15]**,** TLC [16], iontově selektivní elektrody a polarografické metody [17,18].

Analýza ZOP v biologických matricích je komplikovaná díky jeho nestabilitě v určitých rozpouštědlech, např. v methanolu, kyselých a bazických rozpouštědlech. Standardní roztok by měl být připraven v acetonitrilu a extrakce by měla být provedena do neutrálního pH k zajištění stability [19]**.**

V literatuře je popsáno několik metod pro enantioselektivní analýzu ZOP a jeho metabolitů. Enantiomery ZOP byly analyzovány použitím kolony Chiracel OD-H s mobilní fází ethanol – hexan (60:40, v/v) a detekovány pomocí fluorescenčního detektoru [14]**.** ZOP a jeho enantiomery byly kvantifikovány ve vzorcích moči pomocí kapilární elektroforézy s β-

cyklodextrinem jako chirálním selektorem. Detektorem s laserem indukovanou fluorescencí byl dosažen detekční limit 6 ng/ml pro každý enantiomer [20]. Fernandéz a spol. popsali metodu stanovení ZOP a jeho metabolitů v moči s použitím kombinovaného HPLC systému s achirální a chirální kolonou a s fluorescenční detekcí [13]. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí byla použita k detekci ZOP v různých matricích s detekčními limity kolem 0,29ng/g. Tonon a spol. uvedli enantioselektivní metodu využívající spojení HPLC s hmotnostní detekcí s mezí stanovitelnosti 7,5 ng/ml pro každý enantiomer [1,21]. Stereoselektivní stanovení ZOP a jeho nečistot v tabletách je možné pomocí kapilární elektroforézy s UV detekcí. Analýza ZOP a jeho nečistot v tabletách byla provedena nejprve extrakcí do acetonu a separací na nepokryté kapiláře s použitím fosfátového pufru a karboxymethyl-β-cyklodextrinu. Detekce probíhala při 200 nm a 305 nm. Tonon a spol. dosáhli lineární kalibrace v rozsahu 0,4 – 0,8 mg/l pro každý enantiomer [2].

Většina metod stanovujících obsah ZOP v biologických vzorcích vyžaduje extrakční kroky, tradiční extrakci kapalina – kapalina nebo extrakci pevnou fází. Oba tyto postupy jsou zdlouhavé a náročné na chemikálie. El-Shaheny a spol. uvedli metodu, která stanoví obsah ZOP a jeho degradačních produktů bez předchozí extrakce v moči. Použili metodu micelární kapalinové chromatografie s fluorescenčním detektorem. Analýzu provedli na BDS Hypersil fenylové koloně a jako mobilní fázi použili směs SDS, n-propanolu, triethylaminu a fosforečné kyseliny [7].

Ke stanovení ZOP se dají použít techniky adsorpční rozpouštěcí voltametrie. Yilmaz dosáhl nejlepších výsledků použitím diferenčně pulzní adsorpční rozpouštěcí voltametrie na elektrodě ze skelného uhlíku. Dosáhl meze detekce $2{,}78 \times 10^{-7}$ mol/l a meze stanovitelnosti $5{,}28 \times 10^{-7}$ mol/l [22]. Další elektrochemické stanovení ZOP provedl J.C.Viré a spol. Pomocí DC polarografie a adsorpční rozpouštěcí voltametrie na elektrodě ze skelného uhlíku dosáhli detekčních limitů 1×10^{-7} mol/l a 2×10^{-10} mol/l [18].

2.5. Elektrochemické vlastnosti

Redukci zopiklonu studoval J.C.Viré a spol. [18]. K analýze použili DC polarografii, cyklickou voltametrií, diferenčně pulzní a square-wave polarografii na rtuťové elektrodě. Pracovní elektrolyt byl připraven z Britton-Robinsonova pufru v rozmezí pH 1 – 12. Redukce ZOP probíhá ve dvou krocích. První krok odpovídá dvouelektronovému přenosu. Proces je

reversibilní v kyselém prostředí, kolem pH 7 je kvazireversibilní a v alkalickém prostředí je ireversibilní. Tento redukční krok odpovídá redukci pyrazinového kruhu za vzniku 1,4-dihydropyrazinu. V alkalickém prostředí se proces stává ireversibilním z důvodu tautomerizace 1,4-dihydropyrazinu na hůře oxidovatelný 1,2- nebo 1,6-dihydropyrazin. Druhý redukční krok se projevuje špatně definovaným píkem v blízkosti potenciálu redukce základního elektrolytu. Proces je ireversibilní v celém rozsahu měřeného pH. Jedná se rovněž o dvouelektronovou reakci. V určitém rozmezí pH (pH 5 – 9) se vyskytuje ještě třetí, velmi strmý pík. Z naměřených dat vyplývá, že druhý pík je ovlivněn adsorpcí. Třetí pík se vyskytuje pouze v čistě vodném prostředí. V přítomnosti ethanolu se neobjevuje. Třetí pík odpovídá stejnému procesu jako druhý pík, ale s látkou v adsorbovaném stavu. Po dosažení potenciálu třetího píku je adsorbovaná molekula desorbována a okamžitě redukována. Poloha redukčního centra v molekule odpovědná za druhý pík je dále diskutována v práci [18].

Yilmaz oxidoval zopiklon na elektrodě ze skelného uhlíku pomocí technik adsorpční stripping voltametrie a osteryoung square-wavevoltametrie. Jako základní elektrolyt byl použit Britton-Robinsonův (BR) pufr, kyselina sírová, acetátový pufr a fosfátový pufr. Zopiklon poskytoval ireversibilní anodický pík okolo potenciálu 1 V v BR pufru pH 7,8. Voltametrický proud má adsorpční charakter a je závislý na pH. Dále se Yilmaz zabýval vývojem metody pro voltametrické stanovení ZOP a blíže nespecifikoval mechanismus oxidace ZOP [22].

3. Elektrochemická analýza a stanovení léčiv

Elektrochemie má mnoho výhod, které ji dělají atraktivní v analytické chemii. Elektrochemie vždy poskytovala analytické techniky charakterizované instrumentální jednoduchostí, cenovou dostupností a mobilitou [23].

Elektroanalytické techniky vycházejí z poznatků elektrochemie, která zahrnuje všechny jevy, ve kterých je chemická změna výsledkem elektrických sil a opačně, kdy je elektrická síla generována chemickým procesem. Konkrétně se elektroanalytické techniky zabývají elektrickými veličinami, jako je elektrický proud, potenciál, náboj apod. a jejich vztahem k chemickým parametrům [24].

Voltametrické techniky, ve kterých je vzorek analyzován měřením proudu v závislosti na vloženém potenciálu, jsou v posledních letech velmi populární. Mohou být použity k analýze elektrochemických reakcí [25], studiu elektrochemicky generovaných volných radikálů [26], v modelových studiích enzymatické katalýzy [27], v přeměně solární energie [28], v monitoringu životního prostředí [29], v průmyslové analýze [30] a při analýze stopových koncentrací biologicky a klinicky důležitých látek [31,32].

Aplikace elektrochemie zahrnuje, mimo jiné, analýzu elektrodového mechanismu. Zjištění redoxních vlastností látek, konkrétně poté léčiv, nám může pomoci nastínit jejich metabolický osud v *in vivo* redoxních procesech nebo jejich farmakologickou aktivitu.

Díky podobnosti mezi elektrochemickými a biologickými reakcemi můžeme usoudit, že oxidačně/redukční mechanismy, které se odehrávají na povrchu elektrody a v tělech organismů mají společné podobné principy. Biologicky důležité molekuly, které mají elektroaktivní centrum, mohou být elektrochemicky prozkoumány pomocí voltametrie různými způsoby. Dále se elektrochemické techniky ukázaly být vhodné ke stanovení farmaceutických substancí v různých matricích. Mnoho aktivních složek, na rozdíl od pomocných látek, může být přímo oxidováno. V posledních letech se používají elektrody z různých materiálů, zejména modifikované elektrody ke stanovování aktivních látek, které podléhají redoxní reakci, na poli klinické a farmaceutické analýzy [24].

3.1. Studium redoxních vlastností látek

Elektrochemické metody se používají, mimo jiné, ke studiu redoxních vlastností látek, zejména ke zjištění mechanismu redoxní reakce či zjištění počtu přenášených elektronů.

Prvním experimentem, který je obvykle prováděn při elektrochemickém studiu látky, je nejčastěji cyklická voltametrie. Její efektivnost je dána rychlým pozorováním redoxních vlastností látky v širokém potenciálovém rozsahu. Výsledné voltamogramy jsou analogií spektrálních metod, kdy získáváme informace o látce v závislosti na energetickém skenu. Cyklická voltametrie je tedy často prvním experimentem v elektrochemických studiích léčiv [33,34], farmaceutických substancí [35-37] a biologických materiálů [38]. Dále je možné pomocí elektrochemických metod sledovat interakce látek s DNA [39].

Acuna a spol. použili cyklickou voltametrii ke kinetické studii hydrolytického rozkladu droxicamu. Zajímali se o možný farmakologický účinek léčiva v organismu člověka.

Droxicam redukovali na visící rtuťové elektrodě (HMDE) ve směsi voda-methanol. Zjistili, že droxicam se časem rozkládá v přítomnosti vody a určili kinetickou rovnici $v = (1{,}93 \times 10^{-3} + 78{,}9\ [D]) \times [D]$, kde D je koncentrace droxicamu v mol/l [34].

Elektrochemické vlastnosti nikotinové kyseliny a nikotinamidu zkoumal Wang na zlaté elektrodě. Mechanismus redoxní reakce látek vysvětlil tvorbou a následným zánikem vazby dusík-kyslík v pyridinovém kruhu. Anodická oxidace je řízena difúzí a katodická reakce adsorpcí. Rozdíly v potenciálech katodických píků kyseliny nikotinové a nikotinamidu vysvětlil různou elektronovou hustotou vzdálených substituentů na pyridinovém kruhu jednotlivých látek [40].

Santos a spol. zkoumali elektrochemické chování albendazolu pomocí rotační diskové elektrody ze skelného uhlíku. Albendazol podléhá anodické ireversibilní oxidaci a mechanismus oxidace leží na hranici mezi kineticky řízeným dějem a difúzně řízeným dějem. Heterogenní konstanta reakce byla stanovena na $k = (1{,}51 \pm 0{,}07) \times 10^{-3}$ cm/s a hodnotu součinu αn stanovil na 0,76 [41].

Bollo a spol. provedli voltametrické stanovení volných radikálů antituberkulozního léčiva z třídy nitroimidazopyranu s označením PA-824. Ze srovnání elektrochemického chování PA-824 a metronidazolu, jehož elektrochemie je dobře prozkoumána, vyplývá, že redukce PA-824 se odehrává na nitro skupině za vzniku anion radikálu. Elektrochemická reakce je dále následována dimerizační reakcí. Zjistili, že PA-824 potřebuje více energie k vytvoření anion radikálu než metronidazol a je také stokrát méně stabilní než odpovídající anion radikál metronidazolu [38].

Další studium redoxních vlastností léčiv provedl Liu se svými spolupracovníky. Cyklickou voltametrií na GCE studoval elektrochemické chování isorhamnetinu. Anodická oxidace zahrnuje přenos jednoho elektronu a jednoho protonu. Reakce je také ovlivněna adsorpcí reaktantu. Koeficient přenosu náboje α stanovili na 0,58 [42].

Voltametrické stanovení ethinylestradiolu provedl Li. Zkoumal vliv přítomnosti cetyl pyridin bromidu (CPB) na elektrochemickou odezvu pomocí uhlíkové pastové elektrody. V případě použití CPB došlo k posunu potenciálu píku k negativnějším hodnotám a také ke značnému zvýšení proudové odezvy. To je způsobeno zvýšenou akumulací ethinylestradiolu díky elektrostatické interakci s CPB na hydrofobním povrchu elektrody. Výhody tohoto uspořádání poté aplikoval ke stanovení ethinylestradiolu ve farmaceutických přípravcích.

Lineární koncentrační rozsah byl 5×10^{-8} mol/l – 2×10^{-5} mol/l a detekční limit 3×10^{-8} mol/l [43].

Znalost redoxních vlastností látek, např.: závislosti proudové odezvy na pH, rychlosti skenu, zjištění adsorpčních vlastností na elektrodách a v různých prostředích atd., jsou důležité pro vývoj elektroanalytické metody ke stanovení daných lítek v různých matricích.

3.1.1. Analýza léčiv na různých typech elektrod

Elektrody pro voltametrická měření jsou nejčastěji vytvořeny z pevných nebo kapalných kovů či z uhlíku. Méně časté jsou oxidy kovů nebo polymery. Chemicky modifikované elektrody jsou takové, jejichž povrch je pokryt tenkým filmem jiného kovu než je materiál elektrody, nebo jsou pokryty monovrstvou kovalentně vázaných molekul, například thiolové skupiny na zlatou elektrodu. Materiál elektrody by neměl reagovat se základním elektrolytem a rozpuštěnými látkami, kromě některých výjimečných případů. Tuto podmínku nejlépe splňují ušlechtilé kovy, skelný uhlík a grafit. Rtuť je používána pro její kapalné skupenství a pro velké přepětí vodíku. Volba pracovní elektrody je důležitým krokem v elektrochemické analýze, reakce na povrchu elektrody není obvykle jednoduchá a vyskytují se děje, které reakci komplikují. Vhodnou volbou pracovní elektrody a její úpravou, můžeme některé obtíže eliminovat.

Elektrody ve voltametrické analýze mohou být rozděleny dle materiálu, geometrie nebo velikosti, hydrodynamických podmínek, za kterých pracují a modifikace jejich povrchu [44].

3.1.2. Analýza léčiv na rtuťových elektrodách

Rtuť je velmi atraktivní elektroda, protože má vysoké přepětí vodíku a umožňuje tak měření v negativnějších potenciálech oproti tuhým elektrodám. Také poskytuje vysoce reprodukovatelný, okamžitě obnovitelný a hladký povrch. Nevýhodou je limitující anodický rozsah a toxicita rtuti. Existuje několik typů rtuťových elektrod, kapající rtuťová elektroda (DME), visící, rtuťová kapková elektroda (HMDE) a elektroda se rtuťovým filmem (MFE) [23].

Larenas a spol. studovali voltametrické chování zaleplonu (Z léčiva) na kapající rtuťové, visící rtuťové elektrodě a elektrodě ze skelného uhlíku. Metodami diferenčně pulzní polarografie, tast polarografie, cyklické voltametrie a diferenčně pulzní voltametrie zjistili, že zaleplon poskytuje dva ireversibilní katodické píky v rozmezí pH 2 – 12. Z chronocoulometrického experimentu vypočítali, že reakce se účastní jeden elektron v každém redukčním píku. Pro analýzu zaleplonu v kapslích použili metodu DPP při pH pracovního roztoku 4,5 [45].

Kontoyannis a spol. ve své studii o interakci diazepamu a liposomů použil metodu diferenčně pulzní polarografie. Pracovali s roztokem pufru pH 7,4 a jako pracovní elektrodu použili statickou rtuťovou elektrodu. V tomto uspořádání naměřili mez detekce 15 μg/l [46].

Polarografické stanovení diazepamu provedl Guo a spol. použitím peroxodisíranu. Použitím vhodného oxidantu lze u polarografických metod, založených na tzv. "katalytických vlnách", dosáhnout zlepšení citlivosti. Jako pracovní elektrodu použili kapající rtuťovou elektrodu a pracovali s acetátovým pufrem pH 4,7. Získali lineární závislost v rozsahu koncentrace $5{,}6 \times 10^{-8}$ mol/l – $8{,}8 \times 10^{-6}$ mol/l a $8{,}8 \times 10^{-6}$ mol/l – $2{,}0 \times 10^{-4}$ mol/l. Detekční limit stanovili na $9{,}6 \times 10^{-9}$ mol/l [33].

Stanovení meloxicamu metodou DC polarografie, cyklické voltametrie a diferenčně pulzní polarografie (DPP) provedl Altinöz a spol. Na statické kapkové rtuťové elektrodě redukovali meloxicam při -1,49 V proti Ag/AgCl. V prostředí acetátového pufru o pH 4,88 získali metodou DPP lineární závislost v rozmezí koncentrací 0,38 – 150 μg/ml [47].

Dalším, kdo redukoval maloxicam, byl A.M.Beltagi se svojí skupinou. V prostředí Britton-Robinsonova pufru pH 4,0 redukovali meloxicam při -1,28 V proti Ag/AgCl na visící rtuťové elektrodě. Ke studiu elektrochemického chování maloxicamu použili metody normální pulzní, diferenčně pulzní polarografie a cyklické voltametrie. Metodou DPP získali lineární koncentrační závislost v rozmezí $1{,}0 \times 10^{-8}$ mol/l – $5{,}0 \times 10^{-6}$ mol/l [48].

Abd-Elgawad Radi použil ke studiu meloxicamu cyklickou, diferenčně pulzní a square-wavevoltametrii a ke stanovení meloxicamu vyvinul metodu katodické adsorpční rozpouštěcí square-wavevoltametrie. Pracoval v prostředí acetátového pufru a na visící rtuťové elektrodě při pH 5,0 získal redukční pík při -1,42 V proti Ag/AgCl. Jím vyvinutou metodou získali lineární koncentrační rozsah 2×10^{-10} mol/l – 5×10^{-8} mol/l a mez detekce 2×10^{-11} mol/l [49].

Nitroxoline je antibakteriální a antifungální léčivo pro léčbu močových cest. Ghoneim a spol. ve své práci provedli redukci nitroxolinu pomocí různých elektrochemických metod. Jako elektrolyt použili Britton-Robinsnův pufr. Nitroxoline redukovali na rtuťové elektrodě. DC polarografie a různé adsorpční katodické rozpouštěcí voltametrie byly použity k analýze elektrochemického chování a poté stanovení nitroxolinu v různých matricích. Citlivost metod stoupala ve směru od přímé polarografie, diferenčně pulzní-, linearsweep-, až po square-wave adsorpční katodickou polarografii. Meze stanovitelnosti nitroxolinu v čisté formě byly $1{,}02 \times 10^{-6}$ mol/l, $3{,}05 \times 10^{-8}$ mol/l, $9{,}01 \times 10^{-9}$ mol/l a $9{,}12 \times 10^{-10}$ mol/l [50].

I.Baranowska a spol. vyvinuli metodu diferenčně pulzní voltametrie pro stanovení několika léčiv současně v modelových vzorcích a v lidské moči. Analyzovali paracetamol, furosemid, dipyron, cefazolin a dexamethason. Jako pracovní elektrody použili visící rtuťovou kapkovou elektrodu (HMDE) a grafitovou elektrodu. Nejlepší výsledky byly získány pro Britton-Robinsonův pufr o pH 2,4 v němž nalezli lineární kalibrační rozsahy pro jednotlivá léčiva např.: 6,61 μmol/l – 66,10 μmol/l pro paracetamol a 6,05 μmol/l – 54,42 μmol/l pro furosemid [51].

3.1.3. Analýza léčiv na pevných elektrodách

Na rozdíl od rtuti mají elektrody z pevného materiálu širší potenciálové okno v anodické oblasti. Nejčastěji používané materiály jsou uhlík, platina, zlato, dále stříbro, nikl a měď. Poslední tři jmenované se používají spíše ve velmi specifických analýzách.

Důležitým faktorem při používání elektrod z pevného materiálu je závislost proudové odezvy na stavu povrchu elektrody. Použití těchto elektrod vyžaduje pečlivé čištění povrchu elektrod k získání reprodukovatelných výsledků. Toto čištění může být mechanické, elektrochemické, chemické či tepelné v závislosti na použitém materiálu[23].

Loracarbef má antibakteriální aktivitu a je oxidovatelný na elektrodě ze skelného uhlíku. Elektrochemická oxidace loracarbefu byla studována metodami cyklické voltametrie, lineární, diferenčně pulzní a square-wavevoltametrie. Výsledky z cyklické voltametrie značí, že oxidace loracarbefu je ireversibilní a je kontrolována difuzí [52].

Mandič studoval elektrochemickou oxidace azithromycinu a jeho derivátů pomocí GCE. Ve své práci se zaměřil na objasnění mechanismu oxidativního metabolismu u lidí.

Zjistil, že azithromycin podléhá oxidaci jedné nebo obou aminoskupin s následnou chemickou reakcí vzniklého kation radikálu [53].

Wahdan se zabýval stanovením domperidonu v tabletách pomocí diferenčně pulzní voltametrie na elektrodě ze skelného uhlíku. Metodu cyklické voltametrie použil ke studiu elektrochemického chování domperidonu. Zjistil, že anodická oxidace je ireversibilní a je řízena difúzí a adsorpcí. Lineární rozsah použité metody byl $1{,}0 \times 10^{-6}$ mol/l – $2{,}0 \times 10^{-5}$ mol/l s detekčním limitem $4{,}0 \times 10^{-7}$ mol/l [54].

Jednoduchou a rychlou voltametrickou metodu pro stanovení ganciklovir na uhlíkových elektrodách vyvinul Uslu a spol. Oxidace na GCE je závislá na pH a při vyšších koncentracích je ovlivněna adsorpčně-desorpčními ději. Při nižších koncentracích je kalibrační křivka lineární, konkrétně v rozsahu 1×10^{-6} mol/l až 1 x 10^{-4} mol/l s detekčním limitem $8{,}1 \times 10^{-8}$ mol/l. Těchto hodnot dosáhl metodou DPV. Metodou SWV dosáhl linearity ve stejném rozsahu a detekčního limitu $4{,}52 \times 10^{-8}$ mol/l [55].

Elektrochemickou oxidaci formoterolu ve vodném prostředí na GCE provedl Demircigil. Metodou CV zjistil, že oxidace formoterolu je řízená difúzí. Dále použil metody DPV a SWV ke stanovení obsahu formoterolu v čisté formě, kdy určil lineární rozsahy 8×10^{-6} mol/l – 6×10^{-5} mol/l pro DPV i SWV a meze detekce $3{,}54 \times 10^{-7}$ mol/l pro DPV a $4{,}04 \times 10^{-7}$ pro SWV a meze stanovitelnosti $1{,}18 \times 10^{-6}$ mol/l pro DPV a $1{,}35 \times 10^{-6}$ mol/l pro SWV [56].

Voltametrické studium hydrochlorothiazidu (HCTZ) na GCE provedl Razak. Pomocí cyklické voltametrie určil, že oxidační proces je ireversibilní a řízený difúzí. Metodou DPV poté stanovil obsah HCTZ ve vzorku moči. Kalibrační křivka byla lineární v rozsahu 24 ng/ml – 320 ng/ml a mez detekce byl 5,0 ng/ml. Voltametrickou metodu dále porovnal s HPLC metodou. Oproti HPLC metodě je elektrochemická metoda rychlejší a méně náročná na přípravu se srovnatelnou citlivostí. HPLC metoda má však výhodu v současném stanovení léčiva a jemu podobných substancí [57].

Elektrodu ze skleného uhlíku použil de Oliveira k voltametrickému stanovení fenbendazolu ve veterinárních přípravcích. Metodami LSV, SWV a DPV studoval elektrochemické chování fenbendazolu. Ten podléhá anodické ireversibilní dvouelektronové oxidaci. Detekční limity získané jednotlivými metodami jsou $5{,}2 \times 10^{-5}$ mol/l pro LSV, $5{,}0 \times 10^{-6}$ mol/l pro DPV a $5{,}0 \times 10^{-5}$ mol/l pro SWV [58].

Elektrochemické stanovení repaglinidu provedl El-Ries. K tomuto účelu použil metodu diferenčně pulzní voltametrie. Na uhlíkové pastové elektrodě dosáhl lineární závislosti pro koncentrační rozsah 8,0 × 10^{-7} mol/l – 3,2 × 10^{-6} mol/l a na elektrodě ze skelného uhlíku lineární závislost 4,0 × 10^{-7} mol/l – 4,0 × 10^{-6} mol/l. Meze detekce a stanovitelnosti na uhlíkové pastové elektrodě získal 1,348 × 10^{-7} mol/l a 4,494 × 10^{-7} mol/l. V případě skelného uhlíku potom 1,062 × 10^{-7} mol/l respektive 3,54 × 10^{-7} mol/l. Měření provedl v prostředí Britton-Robinsonova pufru [59].

Elektrochemickou oxidaci cisatrakuriumu na uhlíkové pastové elektrodě provedl Torres a spol. Optimalizoval metodu cyklické a diferenčně pulzní voltametrie a poté stanovil obsah léčiva v lidské moči a séru. Metodou diferenčně pulzní voltametrie dosáhl meze detekce 0,38 μg/ml ameze stanovitelnosti 1,26 μg/ml [60].

Elektrodu tvořenou diamantovým filmem dopovaným bórem (BDD)použil Wangfuengkanagul k analýze acetaminofenu. Metodami cyklické voltametrie, hydrodynamické voltametrie a průtokové metody s ampérometrickou detekcí porovnávali BDD a GCE. Z průtokové analýzy získali lineární závislost 0,5 × 10^{-6} mol/l – 50 × 10^{-6} mol/l a mez detekce 10 × 10^{-9} mol/l. Pro voltametrické měření byl lineární dynamický rozsah 0,1 × 10^{-3}mol/l – 8 × 10^{-3} mol/l [61].

3.1.4. Analýza léčiv na modifikovaných elektrodách

Chemicky modifikované elektrody představují moderní přístup k elektrodovým systémům. Umístění modifikátoru na povrch elektrody přidá vlastnosti tohoto modifikátoru k vlastnostem elektrody. Taková úprava povrchu elektrody umožňuje elektrochemické měření jinak problematických soustav. Modifikované elektrody mohou zlepšit rychlost reakce přenosu elektronu nebo zvýšit selektivitu, citlivost či stabilitu [23].

Modifikaci GCE publikoval Fan a spol. K pokrytí povrchu GCE elektrody použili nanočástice TiO_2 s grafenem. To vedlo ke zlepšení elektrochemické reaktivity a voltametrické odezvy paracetamolu. K nanesení modifikační směsi použili Nafion. S touto elektrodou dosáhli lineární závislosti 1 × 10^{-6} mol/l – 100 × 10^{-6} mol/l a detekčního limitu 2,1 × 10^{-7} mol/l paracetamolu. Měření prováděli ve fosfátovém pufru pH 7,0 [62].

Wang modifikoval CPE stříbrnými nanočásticemi za účelem stanovení benorilatu metodou DPV. Touto modifikací dosáhl lineárního rozsahu $1{,}0 \times 10^{-7}$ mol/l – $2{,}5 \times 10^{-4}$ mol/l s detekčním limitem $1{,}0 \times 10^{-8}$ mol/l [63].

Dalším běžně používaným léčivem, které bylo elektrochemicky studováno, je diazepam. Ke stanovení diazepamu použil Naranjo-Rodríguez uhlíkovou pastovou elektrodu (CPE) modifikovanou zeolitem a bentonitem. Studoval elektrochemické chování dizepamu v biologických tekutinách metodami cyklické a diferenčně pulzní voltametrie. Dále prováděli měření v různých prostředích. Nakonec použili vyvinutou metodu pro stanovení dizepamu v krevní plazmě [64].

Další modifikací GCE je použití filmu z poly(methylčerveně) (PMRE) ke stanovení norfloxacinu, které provedl Huang a spol. Touto modifikací získali zvýšení proudové odezvy oxidačního píku norfloxacinu. Lineární kalibrační rozsah byl v rozmezí 1×10^{-6} mol/l – 1×10^{-4} mol/l a detekční limit 1×10^{-7} mol/l [65].

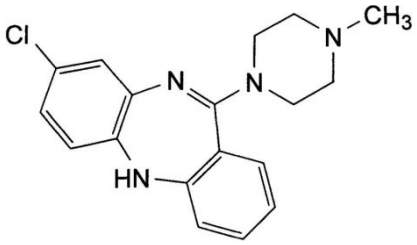
Paracetamol (acetaminofen) byl voltametricky stanovován s použitím elektrody ze skelného uhlíku (GCE), pokryté jednostěnnými uhlíkovými nanotrubičkami (SWNT) modifikované dicetylfosfátem. Modifikovaná elektroda poskytuje oproti nepokryté GCE výrazně lepší proudovou odezvu. SWNT má velký povrch a silné adsorpční vlastnosti, tím zlepšuje elektrochemickou detekci paracetamolu. Použitím takto modifikované elektrody lze dosáhnout lineární závislosti v rozmezí $1{,}0 \times 10^{-7}$ mol/l – $2{,}0 \times 10^{-7}$ mol/l a mez detekce $4{,}0 \times 10^{-8}$ mol/l metodou square-wavevoltametrie. Fosfátový pufr o pH 6,5 byl použit jako základní elektrolyt [66].

Paracetamol je také možné stanovit pomocí planární pyrolytické grafitové elektrody modifikované mnohostěnnými uhlíkovými nanotrubičkami. Tato elektroda byla použita pro techniky cyklické a „square-wave adsorpční rozpouštěcí“ voltametrie (SWAdsSV). Lineární závislost je uváděna od $0{,}1 \times 10^{-6}$ mol/l do 25×10^{-6} mol/l a detekční limit 45×10^{-9} mol/l pro cyklickou voltametrii. Pro AdsSV jsou uváděny dvě lineární závislosti, $0{,}01 \times 10^{-6}$ mol/l – 2×10^{-6} mol/l a 2×10^{-6} mol/l – 20×10^{-6} mol/l. Detekční limit je 10×10^{-9} mol/l. K měření použili fosfátový pufr pH 7,5 [67].

3.2. Elektrochemie látek obsahující piperazinový kruh

3.2.1. Clozapin

Clozapin je léčivo určené k léčbě schizofrenie. Jeho struktura je na obr. 4. Stejně jako zopiklon, jehož elektrochemické vlastnosti a přeměny byly zkoumány v této práci, obsahuje piperizinový kruh s methylovou skupinou.



Obr.4. Struktura clozapinu [68].

Kaufmann a spol. studovali elektrochemické chování clozapinu na uhlíkové pastové elektrodě. Při nízkých hodnotách pH pracovního pufru se objevuje jeden oxidační pík. Z naměřených dat určili, že oxidace probíhá ECE mechanismem. Také zjistili, že se clozapin adsorbuje na povrch elektrody při koncentracích nižších než 10^{-4} mol/l. Oxidační reakce clozapinu je závislá na pH [68].

Hernandéz a spol. použili ke studiu elektrochemie clozapinu elektrodu ze skelného uhlíku a modifikovanou pastovou elektrodu (CPME). Pastová elektroda byla modifikovaná sepiolitem. Jako metodu použili anodickou rozpouštěcí voltametrii. Po optimalizaci nastavení metody dosáhli lineárního rozsahu 0,06 – 0,33 ug/ml a detekčního limitu 7,1 ng/ml pro GCE a lineárního rozsahu 0,03 – 0,26 ug/ml a detekčního limitu 34 ng/ml pro CPME [69].

Dalším, kdo studoval elektrochemické chování clozapinu, byl Mashhadizadeh. K analýze použil pastovou uhlíkovou elektrodu modifikovanou nanočásticemi oxidu titaničitého. CPME měla oproti nemodifikované pastové elektrodě lepší proudovou odezvu.

Na záznamu cyklického voltamogramu jsou patrné dva redukční píky a jeden oxidační pík. Při vícenásobných cyklech je možné vidět vznik nového oxidačního píku, který předchází původnímu píku odpovídajícímu oxidaci clozapinu. První redukční pík odpovídá redukci clozapinu, druhý redukční pík a nový oxidační pík odpovídají redoxní reakci nově vzniklé sloučeniny. Vliv rychlosti skenu na proudovou odezvu odhalil vliv adsorpce na

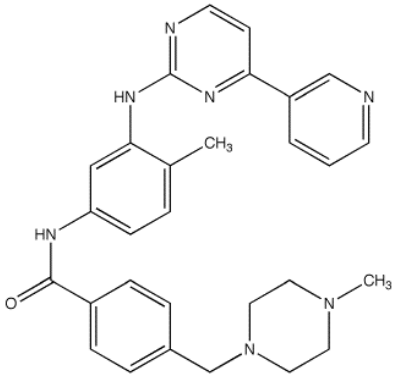
elektrochemickou reakci. Také s rostoucí rychlostí skenu se potenciál posouval do pozitivnějších hodnot, což potvrdilo kinetickou limitaci redoxní reakce.

Dále zkoumali vliv pH na proudovou odezvu. S rostoucí hodnotou pH se zvyšoval proud píku oxidace clozapinu. Největší odezva byla v rozmezí pH 9 -12. S rostoucím pH se zmenšoval katodický pík a při pH 9 již nebyl patrný. Ze závislosti potenciálu píku na pH pracovního roztoku byla vypočítaná zdánlivá disociační konstanta při pH 8. První lineární úsek, v nižších hodnotách pH, má směrnici 0,044 V/pH, což indikuje, že se redoxní reakce zúčastňuje stejný počet elektronů a protonů [70].

Clozapin je metabolizován na dva hlavní produkty, *N* – demethyl clozapin a *N* – oxid clozapin, které jsou méně farmakologicky aktivní než samotný clozapin [71].

3.2.2. Imatinib

Imatinib, prodávaný pod názvem Glivec, je léčivo používané při chemoterapii u pacientů trpících chronickou myeloidní leukémií. Jeho struktura je na obr. 5.



Obr. 5. Struktura Imatinibu [72].

Diculescu a spol. studovali voltametrické chování imatinibu pomocí elektrody ze skelného uhlíku a metodami diferenčně pulzní a cyklické voltametrie. Na záznamu z cyklické voltametrie pozorovali dva anodické píky v anodickém směru polarizace a dva katodické píky v opačném směru polarizace. Při opakovaných cyklech se v anodickém směru polarizace objevil nový pík, při nižším potenciálu než původní píky odpovídající oxidaci imatinibu a docházelo také ke snížení intenzity původních píků vlivem adsorpce imatinibu nebo jeho oxidačních produktů. Dále zjistili, že redukční pík, při nižším potenciálu, odpovídá redukci

produktu oxidace imatinibu. Tento pík a nově vzniklý pík v anodickém směru polarizace tvoří redoxní pár.

Z experimentu vlivu rychlosti skenu na proudovou odezvu zjistili, že oxidace imatinibu je řízená difuzí s vlivem adsorpčních dějů. Při vyšších rychlostech skenu dochází k přechodu reakce z difúzně řízené na kineticky řízenou.

Vliv pH na proudovou odezvu studovali pomocí diferenčně pulzní voltametrie. Potenciál prvního píku klesá s rostoucím pH pracovního roztoku lineárně se směrnicí -59 mV/pH, z toho vyplývá, že reakce se účastní stejný počet protonů a elektronů. Šířka píku v polovině výšky v celém rozmezí měřeného pH vyla 55 mV, což značí dvouelektronový přenos. Druhý anodický pík se na voltamogramech vyskytuje pouze v rozmezí pH 3 – 9. Tento pík rovněž odpovídá oxidaci s výměnou stejného počtu elektronů a protonů. Z šířky píku v půlce výšky, 85 mV, autoři usoudili, že se jedná o jednoelektronovou výměnu [72].

Rodríguez a spol. studovali imatinib pomocí square-wave, diferenčně pulzní a cyklické voltametrie. Ti imatinib redukovali na kapající rtuťové elektrodě. Studovali vliv akumulace imatinibu na elektrodě na proudovou odezvu, dále vliv pH a vyvinuli metodu stanovení imatinibu a jeho metabolitu (*N* – demethylovaný piperazinový derivát) v moči. Metoda square-wave poskytla mez detekce $5{,}55 \times 10^{-9}$ mol/l a metoda rozpouštěcí squre-wave voltametrie mez detekce $5{,}19 \times 10^{-9}$ mol/l [73].

Imatinib je metabolizován převážně enzymy cytochromu P450, konkrétně CYP3A4 a CYP3A5. Hlavním metabolickým produktem je *N* – demethylovaný imatinib, dalšími produkty jsou *N* – oxidy (*N* – oxid na piperazinovém kruhu, *N* - oxid na pyridinovém kruhu), deaminovaný methylpiperazin derivát a hydroxyderivát [74,75].

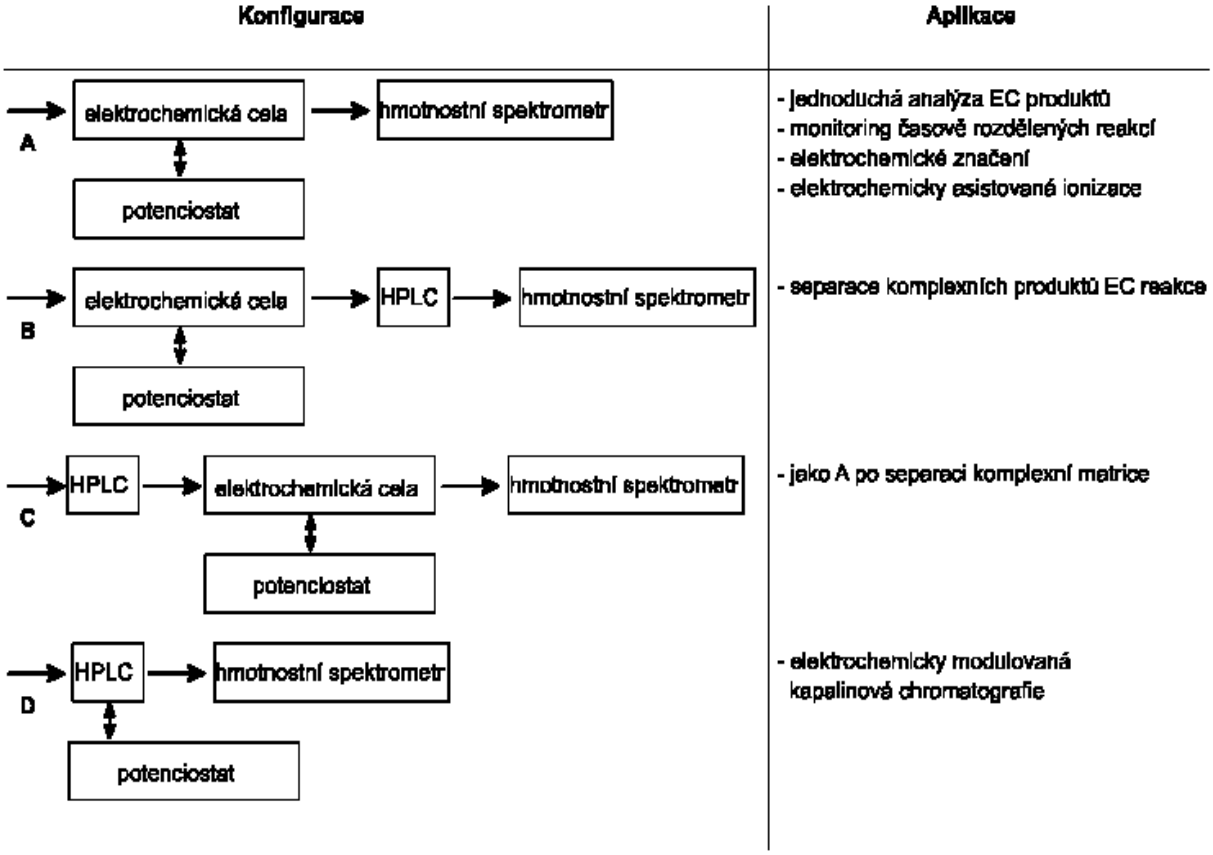
4. Elektrochemie spojená s hmotnostní spektrometrií

Elektrochemie je velmi široká a vyspělá oblast chemie s mnoha aplikacemi a to i v biologických a biomedicínských oblastech. Nejrozšířenější použití v biologických aplikacích je detekce po kapalinové separaci a v biosenzorech. On-line spojení elektrochemických průtokových (flow-through) cel umožňuje kombinaci s dalšími analytickými technikami. Spojení s hmotnostním spektrometrem je však relativně nové [76]. Ačkoli je kombinace elektrochemie s hmotnostní spektrometrií považována za velmi mladou, poprvé byla popsána v literatuře více než před 40 lety. Bruckenstein a Gadde spojili

elektrochemii s hmotnostní spektrometrií pro *in situ* detekci elektrochemicky oxidovaných produktů. Použili porézní platinovou elektrodu, která byla z jedné strany v kontaktu s elektrolyzovaným roztokem a z druhé strany se vstupem do hmotnostního spektrometru. Touto metodou studovali plynné produkty, např. kyslík, generovaný elektrochemickou oxidací 0,1 molární kyseliny chloristé [77]. V roce 1986 Hambitzer a Heitbaum poprvé studovali oxidační procesy on-line spojením EC-MS s ionizací termosprejem. Analýzou produktů oxidace *N,N*-dimethylanilinu zjistili tvorbu dimerů a trimerů, v závislosti na použitém potenciálu [78]**.** Se zavedením ionizace elektrosprejem (ESI) v hmotnostní spektrometrii bylo možné analyzovat termicky labilní a netěkavé látky, což vedlo k rozvoji spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií. Van Berkel ukázal, že přímé spojení EC s MS umožňuje (1) elektrochemickou ionizaci neutrálních látek, (2) studium elektrodových reakcí, (3) prekoncentraci stříbrných iontů a zvýšení signálu v ESI-MS pomocí anodické rozpouštěcí voltametrie [79].

Kombinace hmotnostního spektrometru, jako analytického detektoru s elektrochemickou celou, je vhodná, neboť poskytuje komplementární informace. Navzdory technickým pokrokům, hmotnostní spektrometr nedosahuje citlivosti elektrochemických detektorů, ale jeho schopnost poskytnout identifikaci a strukturální charakterizaci látek je téměř bezkonkurenční. Oxidačně redukční reakce často poskytují produkty lišící se molární hmotností od reaktantů, např. přidáním atomu kyslíku, dehydrogenací. S tandemovou hmotnostní spektrometrií můžeme určit chemickou strukturu produktu.

V mnoha případech může být elektrochemická reakce provedena off-line a produkty mohou být analyzovány zvlášť. On-line spojení má však určité výhody. Umožňuje využít integrovaný automatizovaný systém, je možné analyzovat „krátce žijící“ intermediáty a produkty. Na obrázku 6 je přehled různých kombinací elektrochemie, kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie [76].



Obr. 6. Přehled možných konfigurací spojení EC-HPLC-MS [76].

Vřazení kapalinové chromatografie mezi elektrochemickou celu a hmotnostní spektrometr se ukázalo v některých případech jako nutný krok, neboť záznam hmotnostního spektrometru bez separace produktů elektrochemické reakce není schopen rozlišit mezi případnými izomery nebo produkty se stejným poměrem *m*/*z,* ale rozdílnou polaritou. Retenční časy nám poskytnou informace o polaritě oxidačních produktů a referenční látky mohou být použity k identifikaci produktů těchto látek na základě porovnání retenčních časů. Roztok látky je kontinuálně tlačen skrz elektrochemickou celu, kde dochází k požadované elektrochemické reakci. Poté může být roztok zaváděn přímo do hmotnostního spektrometru, nebo může být veden a sbírán do šesticestného ventilu a následně injektován do kapalinového chromatografu. Zařazením ventilu před kolonu kapalinového chromatografu je možné oddělit podmínky nutné pro elektrochemickou reakci a podmínky nutné pro separaci, např.: pokud je nutné oxidovat při nižším průtoku než jaký je nutný pro separaci nebo elektrolyt, ve kterém je oxidace prováděna, může mít jiné složení než mobilní fáze. Také při ionizaci může docházet k oxidačním reakcím, díky vysokému napětí aplikovanému na ESI rozhraní [80].

ESI je nejvhodnější ionizační technika, je kompatibilní s elektrochemií. Ionizace elektrosprejem je měkká ionizační metoda, při které dochází k minimální fragmentaci nebo dekompozici analytu. ESI uvolňuje ionty z kapalné fáze aplikováním potenciálového rozdílu mezi emitorem elektrospreje a vstupem do MS. Emitor je obvykle kovová jehla o vnitřním průměru v jednotkách μm. Napětí na emitoru je v jednotkách kV. Za určitých podmínek může i materiál chromatografické kolony, například grafit, působit jako elektroda, pokud dojde ke vzniku zemní smyčky s ESI emitorem a MS [76].

Efektivnost emise iontů při ESI klesá s rostoucím průtokem mobilní fáze, 100% efektivnost je dosahována při průtocích v rozmezí 10 – 100 nl/min. Elektrolyty přítomné v mobilní fázi snižují celkovou citlivost ESI-MS. Nízká koncentrace elektrolytů a tedy i nízká vodivost mobilní fáze snižuje odezvu elektrody v elektrochemické cele [76,81].

Je zřejmé, že MS v systému EC-LC-MS poskytuje mnohem komplexnější informace o molekule než samotná elektrochemická detekce. Kvantifikace je tedy častěji prováděna na základě MS dat. Tímto přístupem se eliminují „problémy“ při reprodukování EC dat, jako je nestabilita základní linie nebo nereprodukovatelnost signálu [81]. Hlavní zájmy spojení elektrochemie s kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií leží ve čtyřech hlavních oblastech: (I) studia mechanismu elektrochemických reakcí, (II) on-line elektrochemické derivatizaci za účelem zvýšení citlivosti MS detekce, (III) simulace biologických procesů v organismech, (IV) studia specifického štěpení proteinů a peptidů [76,81].

4.1. Studium mechanismu elektrochemických reakci spojením EC – (HPLC)/MS

Spojení elektrochemie a hmotnostního spektrometru, zvláště potom „on-line“ spojení, je výborný nástroj pro studium chemie přenosu elektronu v roztoku.

Modestov a spol. použili spojení EC-MS ke studiu mechanismu oxidace *N,N*-dimethyl-*p*-fenylenediaminu (DPD). Sledovali různé produkty na základě změny různých experimentálních parametrů chemické reakce, která následovala po reakci přenosu elektronu. Mezi elektrochemickou celu a hmotnostní spektrometr vložili relativně velkou trubici, která sloužila jako reaktor pro následné reakce. Změnou průměru této trubice ovlivňovali čas, během něhož docházelo k následným reakcím, než se částice dostaly do hmotnostního

spektrometru. Tato metoda umožnila měnit reakční čas v rozmezí dvou řádů, konkrétně od 4,3 do 480 s, zatímco tok elektrolytu se měnil jen v úzkém rozsahu. To je důležité, protože tok elektrolytu silně ovlivňuje reakce v elektrochemické průtokové cele a také v ESI/MS. Dalšími parametry, kterými ovlivňovali následné reakce, kromě změny průměru trubice, byly změny v koncentraci reaktantů a elektrolytu, pH elektrolytu, stupeň konverze reaktantu v elektrochemické cele. V své práci zjistili, že mechanismus oxidace DPD zahrnuje paralelní a bočné reakce [82].

Výhody spojení EC-MS demonstroval Bond a spol. oxidativní elektrolýzou diethyldithiokarbamátů mědi, niklu a kobaltu. Navrhli on-line i off-line experimenty, ve kterých sledovali nabité částice těchto látek a s vysokou citlivostí detekovali produkty elektrolýzy jimi vybraných látek [83].

Elektrochemie spojená s hmotnostním spektrometrem může být použita také k analýze kovů v ultrastopových množstvích. S použitím atomové hmotnostní spektrometrie a podobných technik (např.: indukčně vázané plazma, atomová emisní spektrometrie, ICP-AES) jsou tyto analýzy možné. Elektrodové reakce zahrnující anorganické látky mohou být výhodně studovány, analyty mohou být akumulovány a poté uvolňovány z adsorbovaných vrstev na elektrodě. Při analýze ultrastopového množství kovu je vzorek injektován do průtokové EC cely, zvoleným potenciálem může být analyzovaný kov adsorbován na povrch elektrody a to buď jako samotný kov nebo v komplexu s ligandem. Pokud je analyt v matrici, která by způsobovala komplikace při následné analýze, můžeme ji vymýt. Poté je na elektrodu aplikováno napětí, při kterém dojde k desorpci prvku nebo komplexu a následnému vymytí vhodným rozpouštědlem do hmotnostního spektrometru. Oproti analýzám farmaceutických a organických látek zde není třeba chromatografické separace. Nicméně vynechání chromatografických komponent omezuje speciační studium spojením EC – ICP/MS, protože ICP-MS může kvantifikovat pouze celkové množství prvku a EC poskytuje diferenciaci určité elektroaktivní formy pouze pro několik prvků [84].

4.2. On-line elektrochemická derivatizace a úprava vzorků

Elektrochemická cela může sloužit jako elektrochemický on-line reaktor. Velké množství látek, které jsou normálně v MS neaktivní (mají malou nebo žádnou odezvu) může být detekováno po předchozí elektrochemické on-line oxidaci [81].

Chen a spol. použili elektrochemickou oxidaci k rychlé, citlivé a specifické analýze (*p*-chlorofenyl) anilinu (CPA) v biologických vzorcích. Elektrochemickou oxidací generovali dimer CPA, který poté detekovali hmotnostním spektrometrem. Touto metodou dokázali analyzovat CPA s mezí detekce LOD = 20 ng/ml s dynamickým rozsahem 50 – 2000 ng/ml. Validovanou metodu poté použili i v metabolické studii [85].

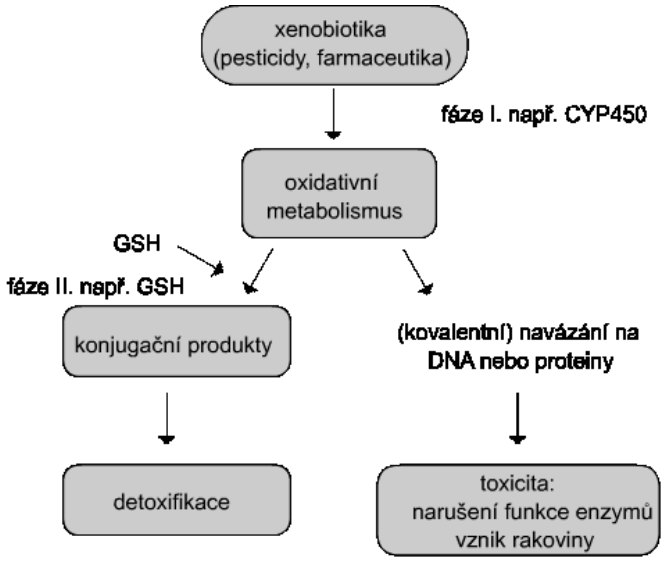
Pretty ve své práci použil tenkovrstevnou průtokovou elektrochemickou celu s MS detekcí pro prekoncentraci a přečištění analytů obsahujících měďnaté ionty. Toto spojení použil pro analýzu Cu^{2+} v množstvích μg/l v matricích, které neumožňují přímou MS detekci, konkrétně 1% (v/v) HNO_3 a 1% (w/w) NaCl. Cu^{2+} ionty převedl do vhodnějšího rozpouštědla elektrochemickou depozicí z původní matrice a následnou oxidací do nového rozpouštědla. Dosáhl meze stanovitelnosti v rozmezí 20-50 μg/l v různých matricích metodou standardního přídavku. Analýza jednoho vzorku netrvala déle než 8 minut[86].

4.3. Vývoj léčiv a oxidativní metabolismus

Osud léčiv a obecně látek přijímaných do organismu, je určován několika procesy zahrnujícími absorpci, distribuci, metabolizaci a exkreci. K zajištění cíleně orientovaného a cenově efektivního vývoje léčiv musí být farmakokinetické a metabolické vlastnosti možného léčebného kandidáta co nejdříve analyzovány a vyhodnoceny, protože vybrané metabolity mohou mít různé vlivy na organismus [87,88].

Většina metabolických procesů v těle se odehrává v játrech. Zjednodušené schéma takového procesu je na obrázku 7. První krok metabolizace látky se nazývá fáze I metabolismu a zahrnuje různé reakce jako je dehydrogenace, hydrolýza a redoxní děje [89]. Jedna z nejdůležitějších reakcí je oxidativní funkcionalizace katalyzovaná enzymy cytochromu P450 (CYP 450). Metabolity z první fáze většinou obsahují funkční skupinu jako je hydroxyl, amino nebo karboxylová skupina. To umožňuje snadnější vyloučení metabolitu, nebo častěji, jeho konjugační reakci s endogenní látkou jako je glutation (GSH) nebo glukuronová kyselina, tyto reakce patří do fáze II metabolismu. Konjugační reakce jsou esenciální pro detoxifikaci a exkreci léčiv, drog a jiných látek, z důvodu vysoké polarity produktů z první fáze. Nicméně některé látky, které prošly fází I, mohou být vysoce reaktivní a mohou se ireversibilně vázat na buněčné makromolekuly, jako jsou proteiny nebo DNA před jejich vstupem do fáze II [79]. Krátká „životnost“ těchto reaktivních látek, mnohdy méně

než jedna minuta, činí jejich detekci v tak komplexních matricích jako je krevní plazma, nebo samotná krev velmi obtížnou až nemožnou [80,90].



Obr. 7. Zjednodušené schéma možné metabolizace xenobiotik [79].

Reaktivní metabolity jsou často chinoidní struktury, které jsou podezřívány z možnosti nukleofilního ataku thiolových skupin malých molekul, jako je cystein nebo GSH. Pokud jsou tyto reaktivní látky vytvořeny v koncentraci vyšší, než je koncentrace thiolů (cysteinu, GSH) v játrech, mohou reagovat s různými proteiny v játrech. To poté vede k nesprávné funkci těchto proteinů, což může být důvod pro toxicitu takových reaktivních látek [79]. K identifikaci těchto reaktivních metabolitů můžeme použít nepřímé analýzy, kdy elektrochemicky generované produkty necháme reagovat s trapovacím činidlem, např. glutathionem. Spojením EC-HPLC-MS můžeme některé reaktivní metabolity analyzovat přímo [80].

Studiem simulace metabolismu spojením elektrochemie s hmotnostní spektrometrií se zabývá především Karst. Ve svých pracích se zabývá identifikací produktů elektrochemické oxidace a porovná je s výsledky z *in vitro* a *in vivo* experimentů [91-93]. Například zjistil, že produkty elektrochemické oxidace boskalidu, které byly podobné produktům nalezeným v *in vivo* experimentu. Boskalid se hydroxyloval a dále se vázal s glutathionem. V této práci zapojil dvě elektrochemické cely za sebou, v první cele byl simulován oxidativní

metabolismus a v druhé byly oxidační produkty redukovány. Tímto zapojením je možné získat informace o regioselektivitě oxidace[93].

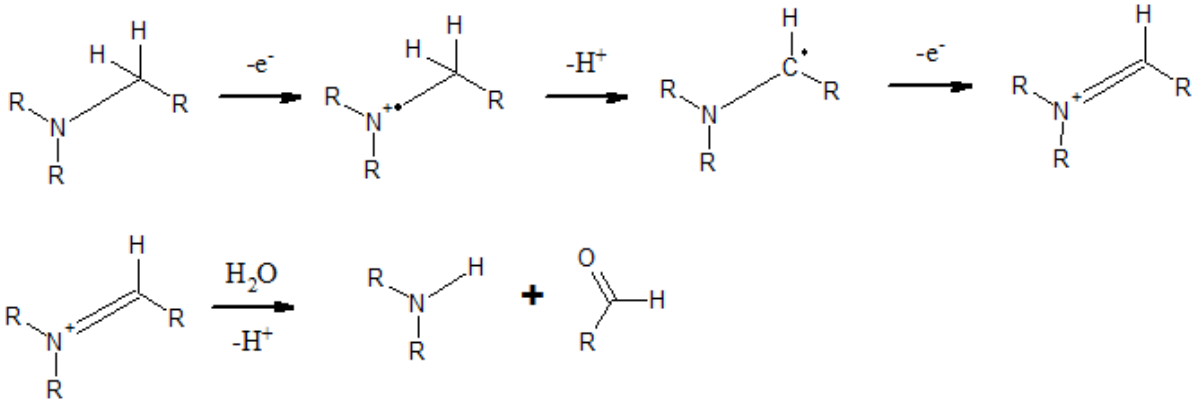
Z výsledků jeho práce je zřejmé, že elektrochemie dokáže simulovat určité enzymové reakce v organismech. Zejména hydroxylace substituovaných aromatických jader, dealkylace aminů, oxidace heteroatomů, dehydrogenace [80].

4.3.1. Oxidace látek obsahující dusíkový atom

Van Leeuwen a spol. provedli analýzu oxidačních produktů clozapinu spojením elektrochemické cely s hmotnostní spektrometrií. Svou prací potvrdili možnost napodobení metabolismu clozapinu spojením metod EC/MS. Clozapin je v závislosti na potenciálu oxidován na několik produktů. Autoři ve své práci detekovali hydroxylované a demethylované deriváty clozapinu [94].

Elektrochemicky byla napodobená *N*-dealkylace metoprololu jako sekundárního aminu [95], camoquinu [96] a také lidokainu [95]. U lidokainu byl také potvrzen vznik *N*-oxidu [97].

Jurva a spol. ve své práci popisují možnou elektrochemickou oxidaci alifatických aminů (obr. 8), konkrétně dealkylaci [98]. V elektrochemickém experimentu je elektron odevzdán elektrodě a vodík je přenesen do látky, která v základním elektrolytu působí jako báze.



Obr. 8. Mechanismus elektrochemické dealkylace [98]

Nicméně by bylo nesprávné si myslet, že spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií je ideální nástroj k predikci metabolismu xenobiotik. Standardní *in vitro* nebo *in vivo* techniky nemohou být nahrazeny čistě instrumentální technikou, která však může

fungovat jako velmi dobrá doplňková metoda a může ušetřit spoustu času při vývoji nových léčiv.

5. Experimentální část

5.1.Chemikálie

Standardy zopiklonu (ZOP) (98%, Farmak, Olomouc, ČR) a zopiklon *N*-oxidu (European Pharmacopoeia Reference Standard, Sigma-Aldrich) byly použity k přípravě zásobních roztoků (c = 1×10^{-3} mol/l) rozpuštěním naváženého množství v acetonitrilu (HPLC čistota, Sigma-Aldrich, ČR). Britton-Robinsonovy pufry (BR) byly připraveny z kyseliny trihydrogen fosforečné, kyseliny octové a kyseliny borité (všechny o koncentraci 0,04 mol/l, p.a., Lachema Brno). Pufry byly upraveny na požadované pH hydroxidem sodným (0,2 mol/l, p.a., Lach-Ner, Neratovice). Octanový pufr (0,1 mol/l) byl připraven titrací octanu amonného (>98%, p.a., Lach-Ner, Neratovice) kyselinou octovou (99%, p.a., Lach-Ner, Neratovice) nebo amoniakem (25% vodný roztok, p.a., Lach-Ner, Neratovice).

5.2. Přístrojové vybavení

Voltametrická měření byla prováděna na přístroji Autolab PGSTAT128N (Metrohm, Nizozemsko) se softwarem NOVA 1.10. Tříelektrodový systém zahrnoval pracovní elektrodu ze skelného uhlíku (GCE, průměr 3,0 mm, Bioanalytical Systems, USA), nebo rotační diskovou elektrodou (RDE, průměr 2,0 mm, Metrohm, Nizozemsko), nasycenou kalomelovou referentní elektrodu (SCE) a platinovou drátkovou pomocnou elektrodu.

Aparatura pro elektrolýzu za konstantního potenciálu se skládala z potenciostatu/galvanostatu 100mA (L-Chem, Horka nad Moravou) s tříelektrodovým systémem elektrod: velkoplošná síťková pracovní elektroda, platinová pomocná elektroda umístěná v odděleném katodovém prostoru a referentní SCE umístěná v odděleném prostoru.

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

Pro on-line spojení elektrochemické cely s hmotnostním spektrometrem byla použita lineární pumpa NE-1002X (New Era Pump Systems, Farmingdale, NY, USA), průtoková cela ESA Conditioning cell 5021A (ESA,Chelmsford, MA, USA) a potenciostat ADLC 1 (Laboratorní přístroje, Praha).

Pro analýzu oxidačních produktů byl použit hmotnostní spektrometr Agilent 1100 Series LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)s ionizací elektrosprejem a analyzátorem iontovou pastí.

5.3. Pracovní postupy

5.3.1. Voltametrické experimenty

Před každým měřením byl povrch GCE vyleštěn suspenzí nanočásticové aluminy na navlhčené mikrovláknové textílii (Buehler, USA). Poté byl povrch opláchnut destilovanou vodou a elektroda byla umístěna do ultrazvukové lázně k odstranění zbytků suspenze. Po 30 s byla elektroda opláchnuta destilovanou vodou a připravena k měření.

Pracovní roztoky pro voltametrická měření byly připraveny smícháním základního elektrolytu (ZE) tvořeného BR pufrem, a acetonitrilem se zásobním roztokem zopiklonu tak aby pracovní roztok obsahoval 50% acetonitrilu. Všechna měření se prováděla ve voltametrické nádobce pro měření malých objemů (max. 2 ml) s fritou z Vycoru.

Byla použita cyklická (CV), lineární (LSV) a diferenčně pulzní (DPV) voltametrie ke studiu elektrochemického chování zopiklonu při různých hodnotách rychlosti skenu a v pufrech o různých hodnotách pH. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny u příslušných voltamogramů. Diferenčně pulzní oltamogramy byly registrovány při modulační amplitudě 25 mV, šířce pulzu 500 mV a rychlosti skenu 20 mV. LSV byla prováděna při rychlosti skenu 20 mV/s a 400 mV/s. Hydrodynamické voltamogramy byly zaznamenány pomocí RDE při rotačních rychlostech 52 rad/s až 314 rad/s. Hydrodynamické voltamogramy byly vyhodnoceny pomocí softwaru el-ChemViewer [99].

5.3.2. Elektrolýza za konstantního potenciálu

Elektrolýza byla provedena v prostředí pufru octanu amonného o koncentraci 50 mmol/l o hodnotách pH 3,5; 6,8 a 9,5. Pracovní roztok obsahoval 50 % acetonitrilu, koncentrace zopiklonu byla 5×10^{-4} mol/l. Potenciály oxidace ZOP byly voleny z cyklických voltamogramů, pro pH 3,5 byl potenciál 1400 mV, pro pH 6,8 byl potenciál 1200 mV a pro pH 9,5 byl potenciál 1200 mV. Vzorky byly elektrolyzovány v míchaném roztoku v celkovém objemu 1,5 ml po dobu 30 minut. Vzorky byly analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru za podmínek uvedených níže v odstavci 4.3.3.

5.3.3. On-line spojení EC/MS

K analýze oxidačních produktů ZOP v on-line spojení byl použit 5×10^{-4} mol/l ZOP v roztoku 50 % acetonitrilu a 50 mmol/l octanového pufru. Z naměřených spekter, která byla snímána při určitém potenciálu, byly vytvořeny „hmotnostní voltamogramy“. Potenciál byl měněn v rozsahu 0 – 800 mV proti Pd/H_2 nejprve po 100 mV, v oblasti oxidace ZOP poté po 50 mV. Pro každý potenciál bylo hmotnostní spektrum zaznamenáváno po dobu 1 minuty. Rychlost průtoku vzorku byla 4 µl/min. Hodnoty pH pufru byly stejné jako v případě off-line elektrolýzy.

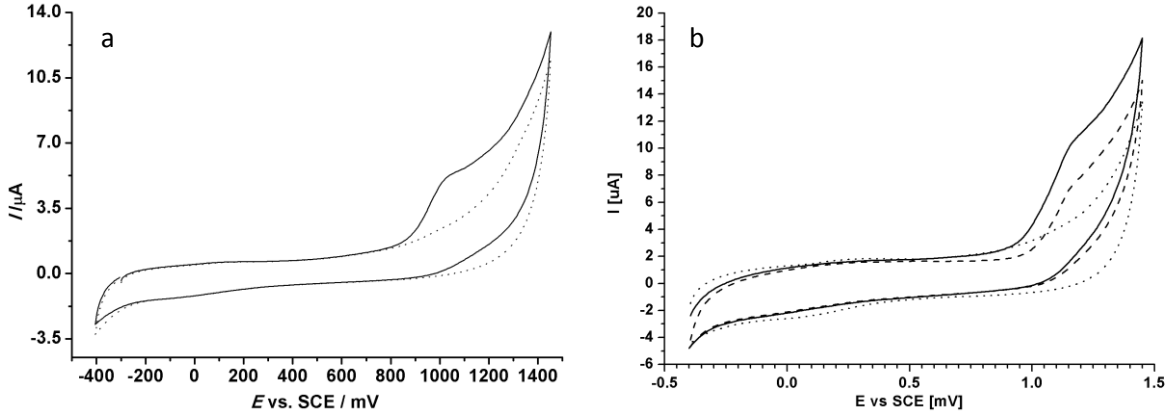
Pracovalo se v pozitivním módu a parametry iontového zdroje elektrospreje byly: napětí vstupní kapiláry do analyzátoru -2400 V, teplota iontového zdroje 150°C, tlak zmlžovacího plynu (N_2) 10 psi, jeho průtok byl 3 l/min. Jako kolizní plyn bylo použito hélium.

6. Výsledky a diskuze

6.1. Elektrochemické chování zopiklonu

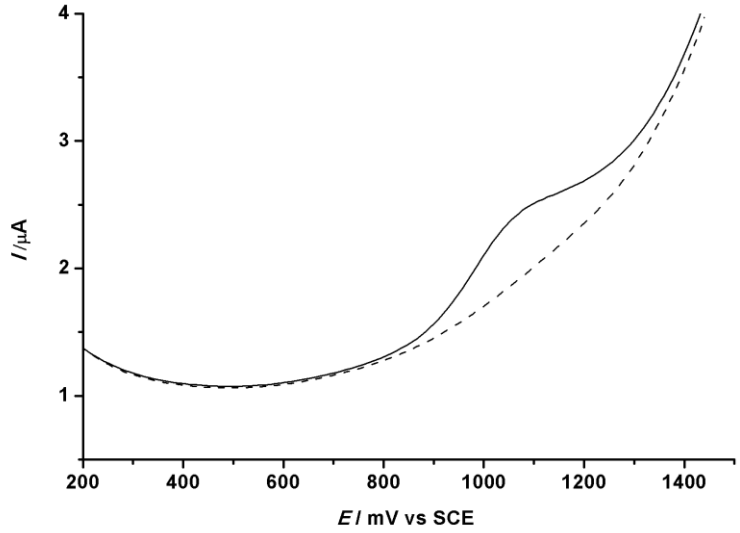
Cyklický voltamogram (obr. 9) ukazuje záznam ZOP v prostředí BR pufru pH 4,8 a 7,5 v acetonitrilu (1:1, v/v). V anodickém směru polarizace je vidět jeden oxidační pík s potenciálem 1025mV (pH 4,8) a 1150 mV (pH 7,5). V katodickém směru polarizace není vidět žádný redukční pík. Z tohoto záznamu můžeme soudit, že oxidace ZOP je ireversibilní

děj. Při experimentech se dvěma opakovanými cykly v jednom měření docházelo ke snížení signálu, to může být zapříčiněno adsorpcí ZOP nebo oxidačních produktů na povrchu elektrody.



Obr. 9. Cyklický voltamogram ZOP, c = 5 × 10^{-5}mol/l, CH_3CN/BR pufr (a) 4.8, (b) 7,5 (1:1, v/v), rychlost skenu 50 mV/s, (⋯) základní elektrolyt, (—) první cyklus, (---) druhý cyklus.

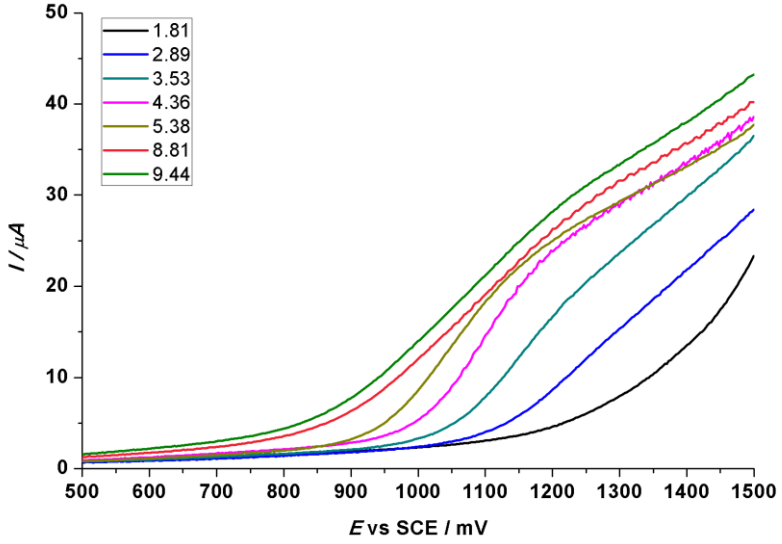
Diferenčně pulzní voltamogram ZOP je na obrázku 10. Je zde také vidět jeden oxidační pík kolem potenciálu 1050mV.



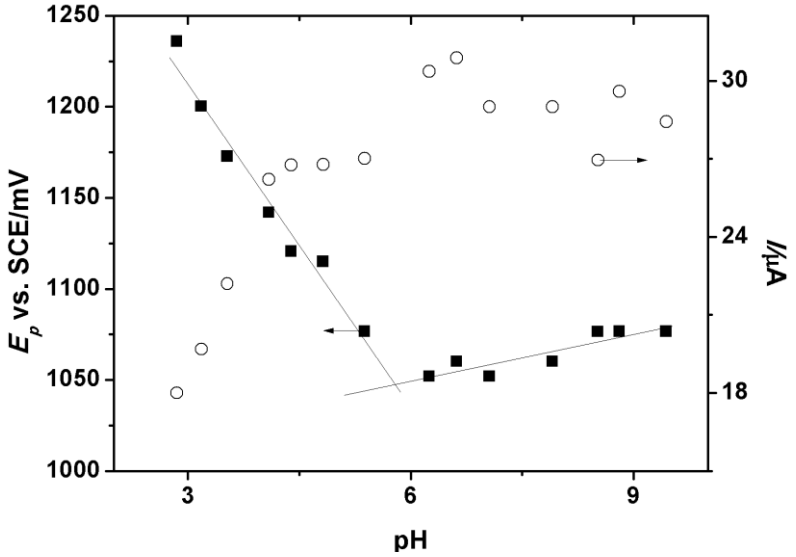
Obr. 10. Diferenčně pulzní voltamogram ZOP, c = 5 × 10^{-4}mol/l, CH_3CN/BR pufr 4,8 (1:1, v/v), rychlost skenu 20 mV/s,výška pulzu 25 mV, šířka pulzu 500 ms, (---) základní elektrolyt, (—) zopiklon.

6.2. Závislost na pH

Metodou CV na statické a metodou LSV na rotační diskové elektroděbyl sledován vliv pH pufru pracovního roztoku na proudovou odezvu oxidace zopiklonu. Na obrázku 11 jsou LSV voltamogramy pro různé hodnoty pH BR pufru. Grafy závislostí limitního proudu a půlvlnového potenciálu na pH jsou na obrázku 12. Anodický signál zopiklonu je patrný v rozmezí pH 2,8 – 9,5. Ve velmi kyselém prostředí (pH 1,9; 2,2 a 2,5) nebyl pozorovaný žádný signál. Limitní proud měřený pomocí RDE se zvyšoval s rostoucí hodnotou pH až k pH okolo hodnoty 6 a poté zůstal téměř konstantní. Oxidace ve alkalickém prostředí pH > 9,5 nebyla testována z důvody rychlého rozkladu zopiklonu [5]. V kyselém prostředí je oxidace zopiklonu závislá na pH. Půlvlnový potenciál klesá do nižších hodnot s rostoucím pH se směrnicí -59 mV/pH, tato hodnota indikuje, že při oxidaci se vyměňuje stejný počet protonů a elektronů. V rozmezí pH 6 – 9,5 je posun půlvlnového potenciálu zanedbatelný. Průsečík regresních přímek dvou lineárních úseků je v pH 5,9 a odpovídá zdánlivé disociační konstantě ZOP. Hodnota disociační konstanty uváděná v literatuře je 6,79 [100].



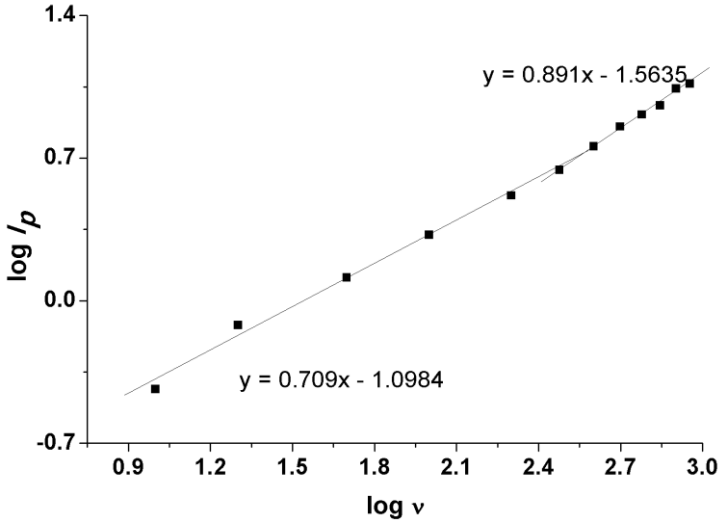
Obr. 11. LSV záznamy ZOP (c = 5 × 10^{-4} mol/l) na RDE při různém pH pufru, 50% ACN, rychlost skenu 400 mV/s, 175 rad/s.



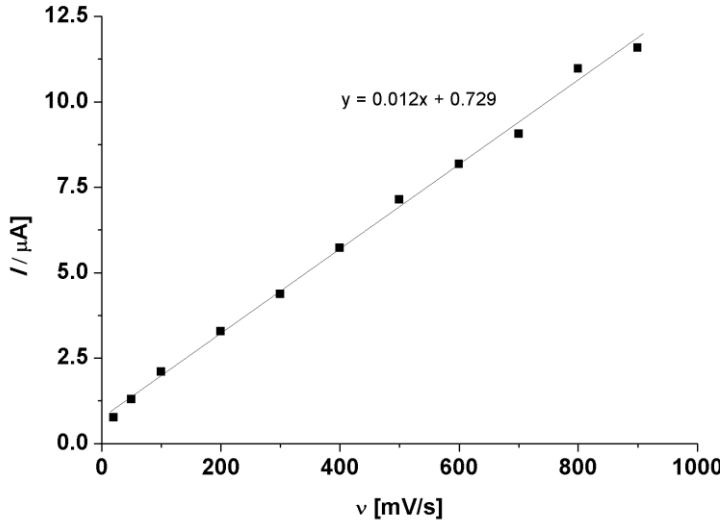
Obr. 12. Závislost půlvlnového potenciálu (■) a limitního proudu (○)zopiklonu(c = 5 × 10^{-4} mol/l)na hodnotě pH pufru, 50% ACN, rychlost skenu 400 mV/s, rotační rychlost 157 rad/s.

6.3. Závislost na rychlosti skenu

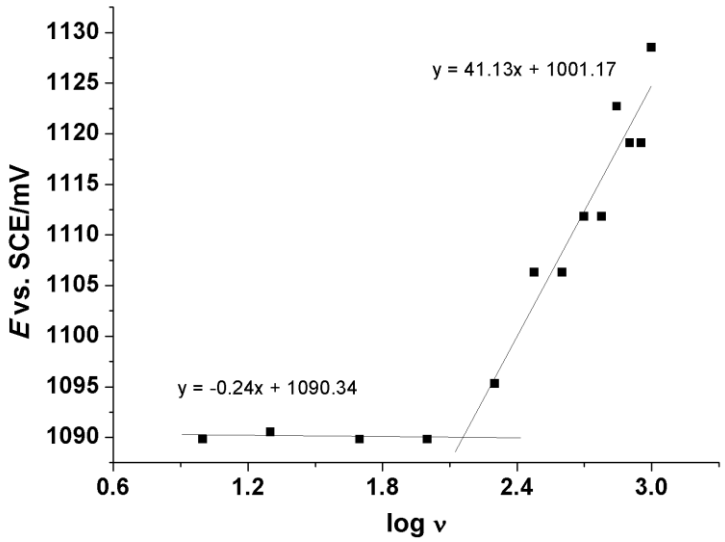
Vliv rychlosti skenu na anodickou odezvu ZOP byl sledován v prostředí BR pufru pH 4,8 v 50 % CH_3CNmetodou LSV se statickou GCE v rozmezí 10 – 900 mV/s. S rostoucí rychlostí polarizace se zvyšuje proudová odezva píku.Závislost log I_p na log v (obr. 13) má dva lineární úseky. První úsek v rozmezí rychlosti skenu 10 – 200 mV/s má směrnici 0,71 a druhý úsek v rozmezí rychlosti skenu 300 – 900 mV/s má směrnici vyšší, konkrétně 0,89. Z těchto hodnot můžeme usoudit, že elektrochemické oxidace zopiklonu je ovlivněna adsorpčními ději (teoretická hodnota pro čistě difúzní děj je 0,5, teoretická hodnota pro čistě adsorpční děj je 1). Podobné chování je vidět i ze závislosti velikosti proudu píku na rychlosti skenu. Tato závislost je pro adsorpcí řízený děj lineární (obr. 14). Závislost potenciálu píku E_p na logaritmu rychlosti skenu je na obr. 15. Potenciál píku se,se změnou logaritmu rychlosti skenu zvyšuje od rychlosti skenu 300 mV/s, při nižších rychlostech skenu zůstává potenciál téměř neměnný. Směrnice závislosti E_p – log $v$jev rozsahu 300 – 900 mV/s má velikost 41 mV/log v. Tato skutečnost indikuje vliv dalších procesů, kromě difuze, v rozhodujícím kroku oxidace při vyšších rychlostech skenu.



Obr. 13. Závislost logaritmu proudu píku ZOP na logaritmu rychlosti skenu. Koncentrace ZOP 5×10^{-5} mol/l, BR pufr 4,8, 50 % CH_3CN.



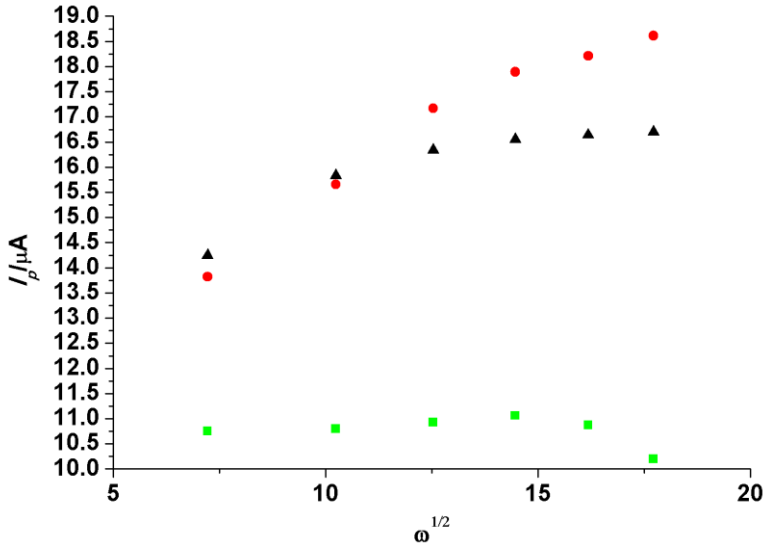
Obr. 14. Závislost velikosti proudu píku na odmocnině rychlosti skenu. Koncentrace ZOP 5×10^{-5} mol/l, BR pufr 4,8, 50 % CH_3CN.



Obr. 15. Závislost potenciálu píku na logaritmu rychlosti skenu. Koncentrace ZOP 5×10^{-5} mol/l, BR pufr 4,8, 50 % CH_3CN.

Rotační diskovou elektrodou byly změřeny hydrodynamické voltamogramy metodou LSV při různých rychlostech rotace elektrody v prostředí s BR pufry pH 4,8; 7,1 a 9,4 (obr. 16). V neutrálním a alkalickém prostředí se proud s odmocninou rychlosti rotace zvyšoval, při velkých rychlostech rotace elektrody limitní hodnota proudu dosáhla limity, proud přestává být závislý na tloušťce difúzní vrstvy. Tento průběh závislosti je typický pro mechanismus ovlivněný difuzí a kinetikou přenosu elektronu. V kyselém prostředí je však limitní proud téměř nezávislý na rychlosti rotace elektrody. Toto chování je obvykle pozorováno u dějů, které jsou řízeny kinetikou přenosu náboje nebo kinetikou chemické reakce předcházející elektrodovou reakci.

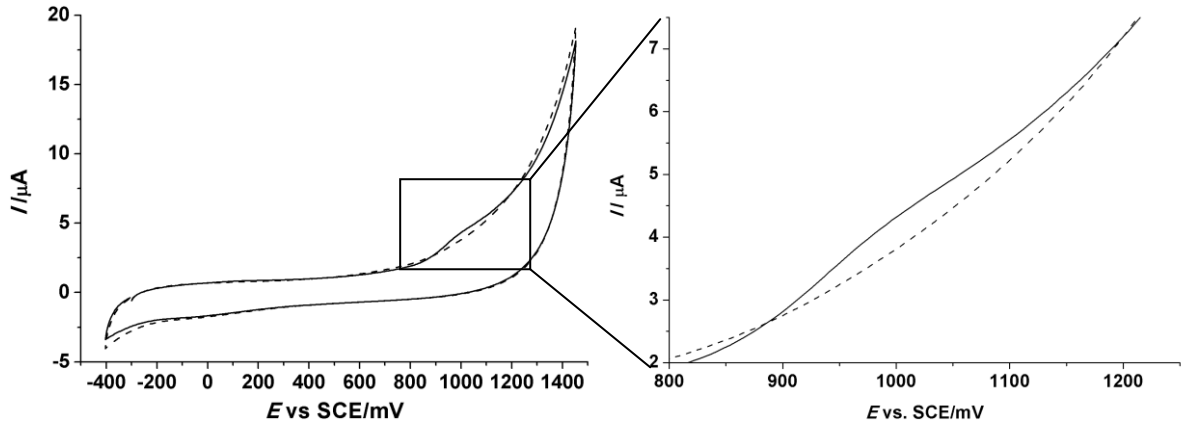
Z uvedených výsledků vyplývá, že elektrochemická oxidace ZOP je poměrně složitý proces ovlivňovaný kromě difúze i adsorpcí látky na elektrodový povrch. V kyselém prostředí se projevuje také silný vliv rychlosti chemické reakce, která předchází přenosu elektronu. Vzhledem nárůstu limitního proudu s rostoucím pH až k hodnotě zdánlivé disociační konstanty lze předpokládat, že touto reakcí je deprotonizace ionizované formy ZOP. V neutrálních a alkalických roztocích se pak vedle difúze a adsorpce uplatňuje také kinetika přenosu elektronu.



Obr. 16. Závislost velikosti píku na odmocnině rotační rychlosti elektrody, 10 mV/s, 50% CH_3CN, (■) pH 4.8; (●) pH 7.1; (▲) pH 9.4

6.4. Vliv adsorpce

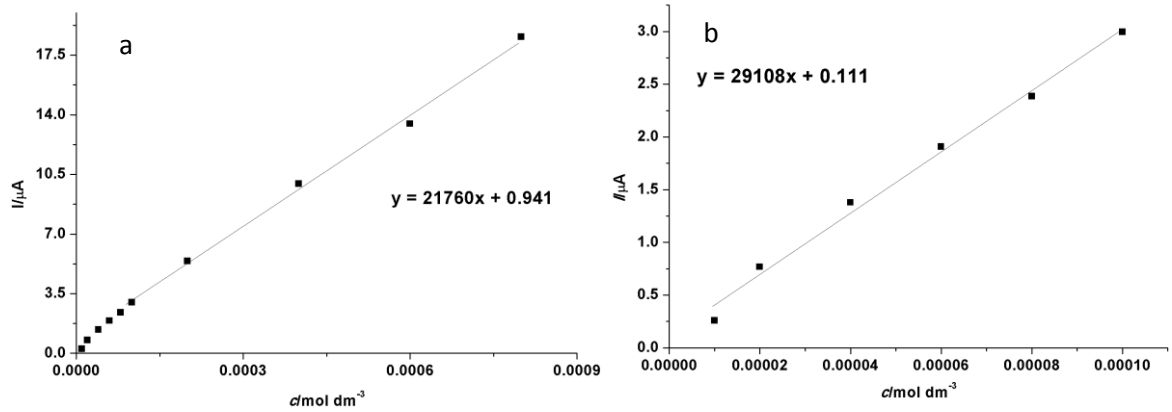
Adsorpce ZOP byla potvrzena experimentem, kdy byla čistá GCE ponořena do zásobního roztoku ZOP na dobu 300 s, poté byla vyjmuta, opláchnuta destilovanou vodou, vložena do roztoku základního elektrolytu a poté byl pořízen záznam cyklickou voltametrií. Na záznamu (obr. 17) byl vidět nárůst proudu oproti základnímu elektrolytu, který odpovídá oxidaci ZOP naadsorbovanému na povrch elektrody.



Obr. 17. CV voltamogram (—) záznam po ponoření elektrody, (---) základní elektrolyt, pH 4,.8, 50%CH_3CN, rychlost skenu 50 mV/s.

6.5. Závislost na koncentraci ZOP

Závislost proudové odezvy na koncentraci ZOP byla měřena pomocí LSV v prostředí BR pufru pH 4,8 v 50 % CH_3CN s rychlostí skenu 50 mV/sv rozmezí koncentrace 5×10^{-6} mol/l až 8×10^{-4} mol/l. Na obrázku 18 jsou kalibrační křivky pro zopiklon. Jsou vidět dva lineární úseky s rozdílnými směrnicemi. První úsek při nižších koncentracích do 5×10^{-5} mol/l má směrnici 29108 μA/mol/l a druhý úsek v rozmezí koncentrací od 5×10^{-5} mol/l do 8×10^{-4} mol/l se směrnicí 21760 μA/mol/l. Nižší hodnota směrnice při vyšších koncentracích, značí výraznější vliv adsorpce na elektrochemickou reakci.



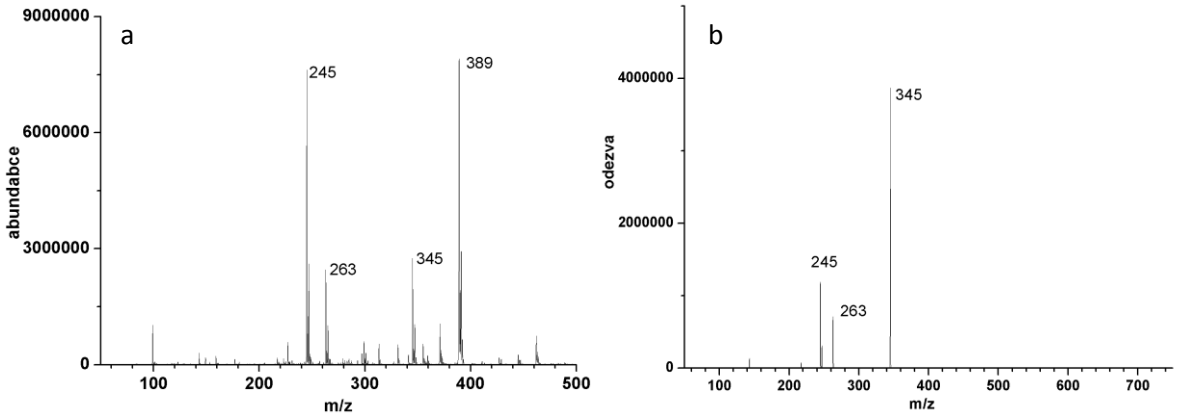
Obr. 18. Kalibrační závislostizopiklonu pro rozsahy koncentrací: 5×10^{-6} - 5×10^{-5}(a) a5×10^{-5} - 8×10^{-4}(b), BR pH 4,8, 50% CH_3CN, 50 mVs^{-1}.

Z kalibrační křivky pro menší koncentrace (do 5×10^{-5} mol/l) byla dále stanovena mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ). LOD byl počítán jako $3 \times (s/m)$ a LOQ jako $10 \times (s/m)$, kde s je směrodatná odchylka proudu píku při nejnižší koncentrace 5×10^{-6}vypočtená z pěti měření a m směrnice kalibrační křivky. LOD byl stanoven na $2{,}47 \times 10^{-6}$ mol/l a LOQ na $8{,}24 \times 10^{-6}$ mol/l.

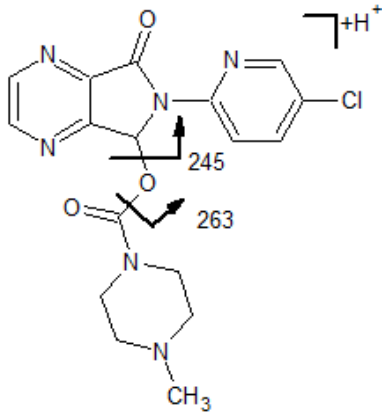
6.6. MS analýza zopiclonu a jeho oxidačních produktů

Pro detailnější charakterizaci oxidačních produktů zopiklonu byla provedena elektrolýza za konstantního potenciálu na velkoplošné platinové elektrodě a následná analýza elektrolyzátu pomocí hmotnostní spektrometrie.

Hmotnostní spektrum standardu zopiklonu je na obrázku 19. Ve spektru je vidět pík při *m/z* 389, který odpovídá protonizované molekule ZOP $[M + H]^+$, dále fragmentové ionty (obr. 18 b) při *m/z* 345, 263 a 245. Navržená fragmentace ZOP je na obrázku 20.



Obr. 19. Hmotnostní spektrum ZOP (a), fragmentační spektrum izolovaného iontu *m/z* 389 (b), koncentrace zopiklonu c = 5×10^{-4} mol/l, směs voda acetonitril 1:1 (v/v) .



Obr. 20. Navržená fragmentace ZOP.

Vznik fragmentů s *m/z* 263 a *m/z* 245 je naznačen na obr. 20. Ion s *m/z* 345 odpovídá ztrátě44 z původního iontu ZOP. Tato ztráta je způsobena odštěpením CO_2 z esterové skupiny [101].

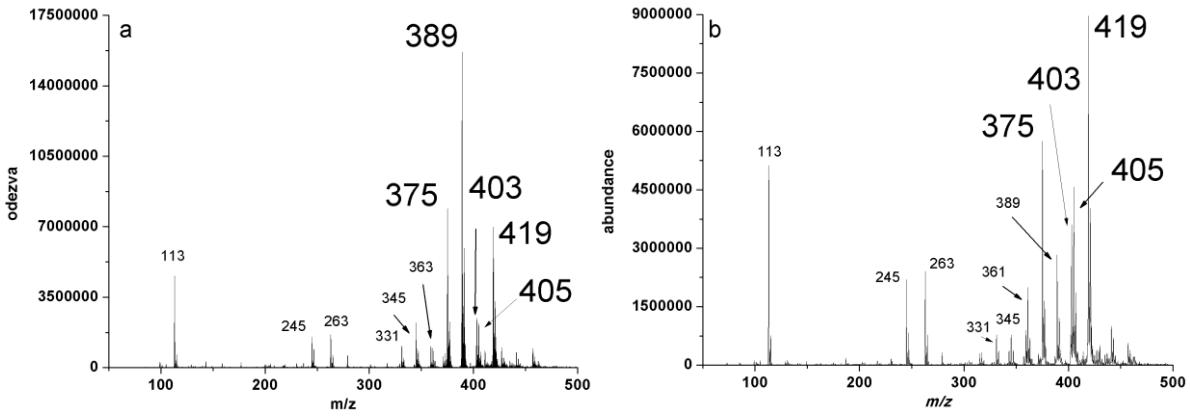
Elektrolýza ZOP s následnou analýzou elektrolyzovaných roztoků hmotnostním spektrometrem byla provedena ve snaze identifikovat látky vznikající anodickou oxidací. Oxidace byla provedena v off-line uspořádání, kdy vzorky byly oxidovány za konstantního potenciálu na síťkové platinové elektrodě ve voltametrické nádobce a poté byly injektovány do hmotnostního spektrometru. V on-line uspořádání byly vzorky vedeny přes průtokovou

elektrochemickou celu, kde došlo k oxidaci a produkty byly přímo zaváděny do vstupu hmotnostního spektrometru. Z hmotnostních spekter změřených v on-line uspořádání při různých potenciálech pracovní elektrody v průtokové cely byly sestrojeny hmotnostní voltamogramy.

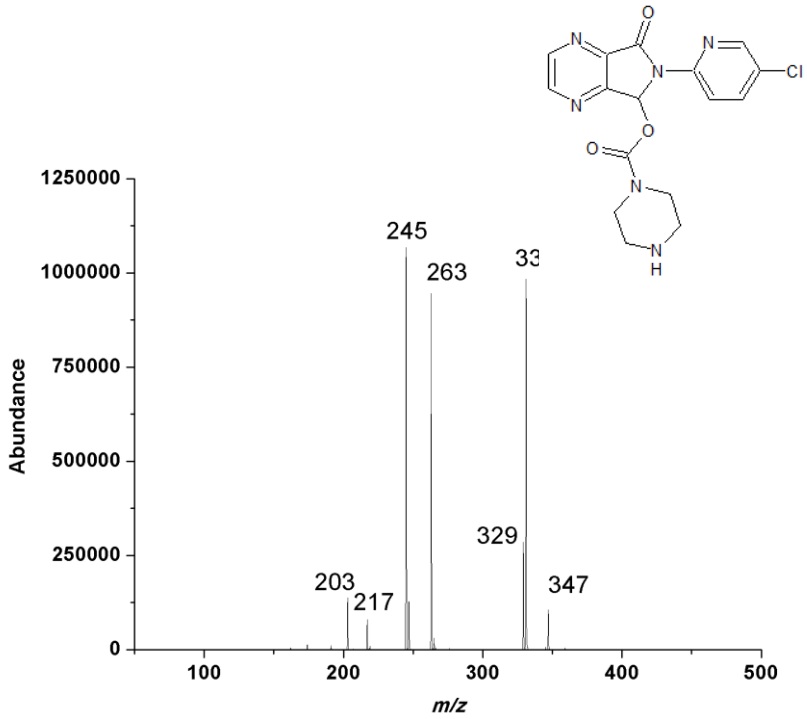
Off-line elektrolýza

Na obrázku 21jsou hmotnostní spektra elektrolyzovaných roztoků ZOP v prostředí 50% CH_3CN v octanovém pufru o různém pH. Koncentrace ZOP před elektrolýzou byla 5×10^{-4} mol/l. V hmotnostním spektru jsou čtyři hlavní signály navrhovaných oxidačních produktů s *m/z* 375, *m/z* 403, *m/z* 405 a *m/z* 419.

První oxidační produkt (P1, *m/z* 375) odpovídá *N*-demethylovanému zopiklonu (rozdíl 14 Da od hodnoty *m/z* ZOP). V MS/MS spektru (obr. 22) je vidět ztráta CO (*m/z* 347) a CO_2 (*m/z* 331). Další signály při *m/z* 263 a *m/z* 245, které jsou zřetelné i ve spektru ZOP značí, že pyridinový a pyrolo-pyrazinový kruh zůstal nezměněn a že k oxidativní demethylaci došlo na piperazinovém kruhu.

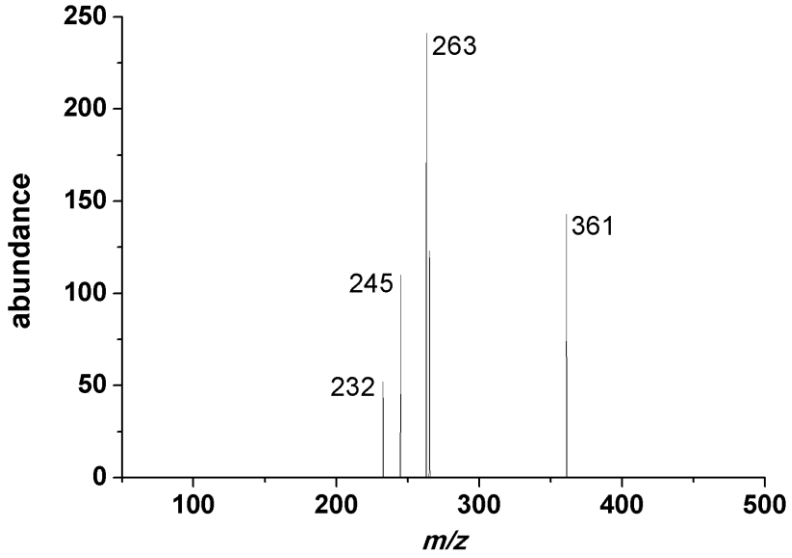


Obr. 21. Hmotnostní spektra elektrolyzátů vzorku ZOP v octanovém pufru o hodnotách pH: a) pH = 3,5; b) pH = 6,8; 50%CH_3CN, koncentrace ZOP před elektrolýzou c = 5×10^{-4} mol/l.



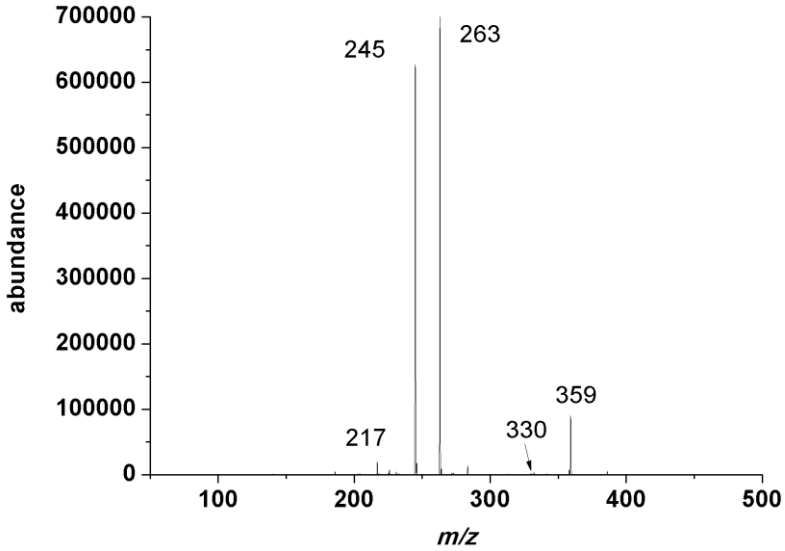
Obr. 22. Fragmentační spektrum izolovaného iont *m/z* 375 a navržená struktura odpovídajícího oxidačnímu produktu P1.

Druhý produkt (P2) má hodnotu *m/z* 405, tedy o 16 Da větší v porovnání s hodnotou *m/z*ZOP, což odpovídá přijetí jednoho atomu kyslíku při oxidaci zopiklonu. Přítomnost fragmentu s*m/z* 263 a *m/z* 245 v MS/MS spektru (obr. 23) značí, že k oxidaci došlo na piperazinovém kruhu. Z literatury [11] je známá tvorba *N*-oxidu při oxidativním metabolismu ZOP. Elektrochemická tvorba *N*-oxidů u léčiv obsahujících terciární dusíkový atom byla také popsána [102]. Proto se lze domnívat, že produkt P2 může vznikat oxidací jednoho z dusíkových atomů na piperazinovém kruhu za vzniku *N*-oxidu. Nicméně nelze vyloučit, že oxidaci podléhá *N*-methylová skupina (za vzniku hydroxymethylové skupiny), případně některý z uhlíků piperazinového kruhu za současného otevření kruhu. Z hmotnostního spektra bohužel nelze blíže určit přesnou pozici kyslíku na methylpiperazinovém skeletu.



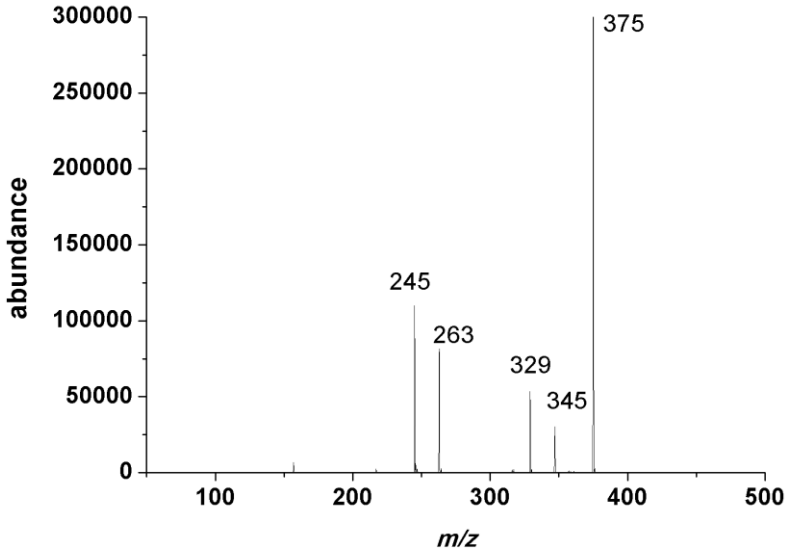
Obr. 23. Fragmentační spektrum izolovaného iontu *m/z* 405.

Pseudomolekulární ion třetího produktu (P3) má hodnotu *m/z* 403, což pravděpodobně odpovídá přijetí jednoho atomu kyslíku a ztrátě dvou vodíků z molekuly ZOP. Přítomnost fragmentů s *m/z* 263 a *m/z* 245 v kolizním spektru (obr. 24), stejně jako v případě dvou předešlých produktů, indikuje, že produkt P3 vzniká oxidací na piperazinovém kruhu. Fragment s *m/z* 359 odpovídá ztrátě CO_2 typické pro ZOP a jeho deriváty. Minoritní fragment s *m/z* 330 odpovídá ztrátě formyl radikálu, což by nasvědčovalo přítomnosti aldehydové skupiny navázané pravděpodobně na jeden z atomů dusíku piperazinového kruhu.



Obr. 24. Fragmentační spektrum izolovaného iontu *m/z 403*

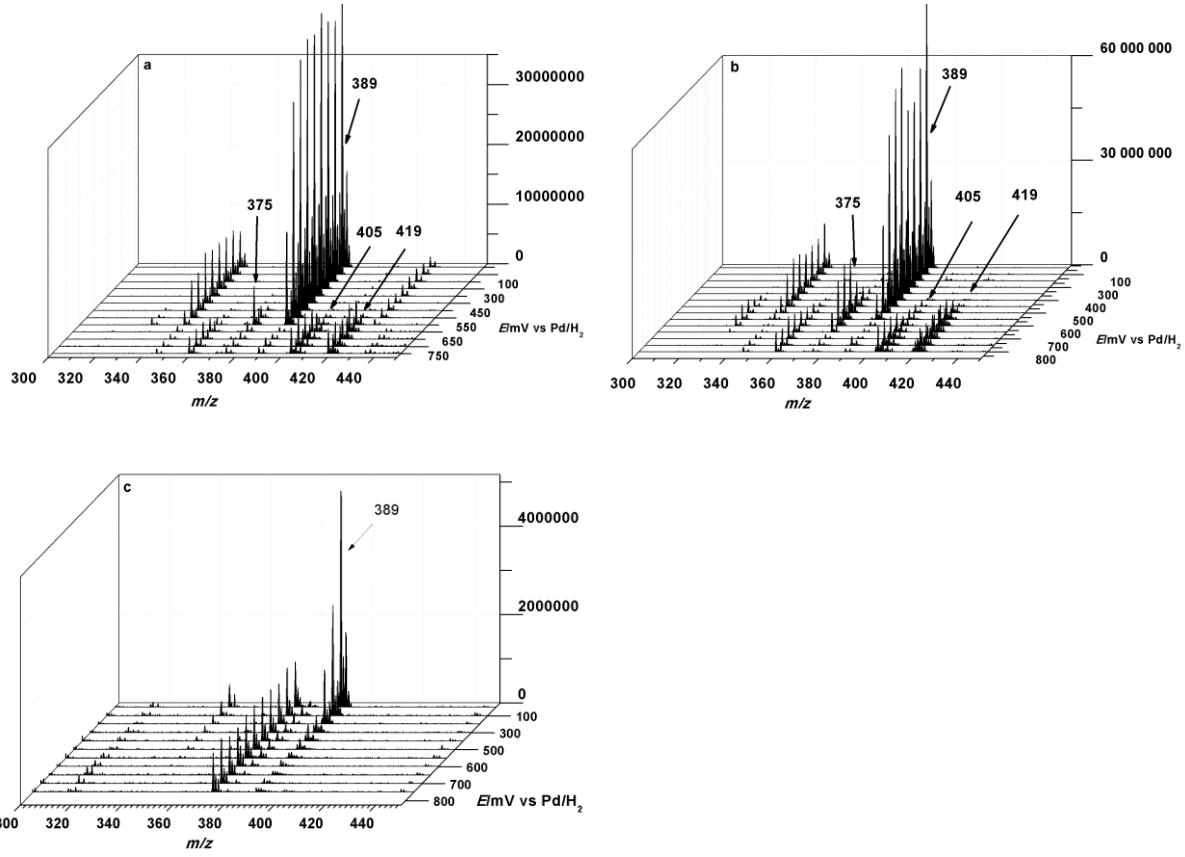
Čtvrtý produkt (P4, *m/z* 419) by mohl být vysvětlen adicí dvou atomů kyslíku a ztrátou dvou atomů vodíku. MS/MS spektrum (obr. 25) ukazuje intenzivní signál odpovídající ztrátě CO_2 (dominantní fragment s *m/z* 375). Jak už bylo zmíněno dříve, fragmenty s *m/z* 263 a *m/z* 245 značí, že k oxidaci dochází na piperazinovém kruhu. Zavedení dvou atomů kyslíku do molekuly zopiklonu může probíhat několika způsoby, které vedou k různým produktům. Jedna z teoretických možností zahrnuje tvorbu *N*-karboxylové kyseliny. Fragmentace sloučenin s karboxylovou skupinou se projevuje typickou ztrátou CO_2 (Δ *m/z* 44 Da). Protože v kolizním spektru je zřetelná pouze ztráta CO_2 z esterové skupiny (fragment *m/z* 375), typická pro ZOP a jeho deriváty, a další ztráta CO_2 z tohoto fragmentu pozorována nebyla, je možnost vzniku *N*-karboxylové kyseliny velmi málo pravděpodobná. Další možností je vznik*N*-oxidu a současně tvorba aldehydové skupiny buď na methylové skupině piperazinového kruhu, nebo na uhlíkovém skeletu piperazinového kruhu za jeho současného otevření. Fragment s *m/z* 345 odpovídá ztrátě formaldehydu z fragmentu *m/z* 375. To značí, že aldehydová skupina byla navázána na jednom z dusíkových atomů piperazinového kruhu. Fragment s *m/z* 329 může být vysvětlen ztrátou kyslíkového atomu z fragmentu s *m/z* 345. Z analýzy kolizního spektra tedy vyplývá, že oxidační produkt P4 pravděpodobně obsahuje jednu aldehydovou skupinu a jeden atom kyslíku navázané na atom dusíku piperazinového kruhu.



Obr. 25. Fragmentační spektrum izolovaného iontu *m/z* 419.

On-line elektrolýza

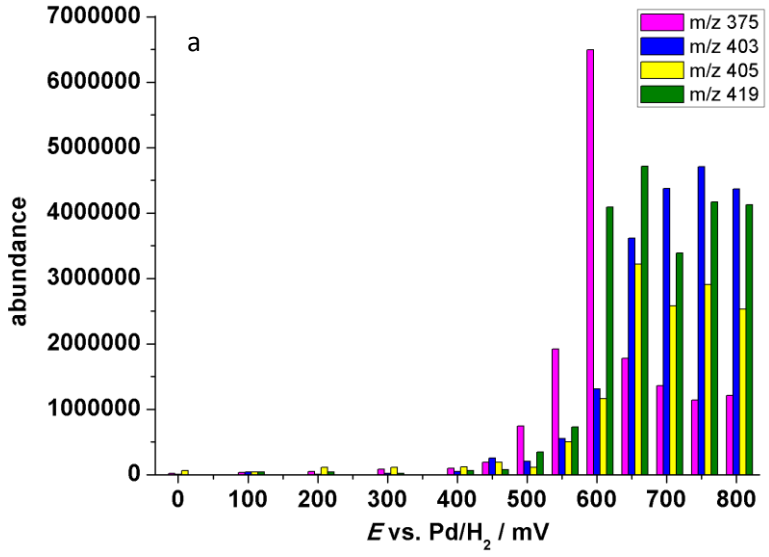
Na obrázku 26 jsou vybrané části hmotnostních voltamogramů vzorků oxidovaných v prostředí pH 3,5 a 6,8pořízené v on-line zapojení elektrochemické cely a hmotnostního spektrometru.Pro větší přehlednost jsou záznamy uvedeny v rozmezí hodnot *m/z* 300 – 450. Rozdíl v oxidačních potenciálech použitých při elektrolýze za konstantního potenciálu v off-line experimentu a při on-line měření je způsoben použitím různých referentních elektrod v obou uspořádáních. Při off-line elektrolýze byla použita SCE jako referentní elektroda, při on-line experimentech byla použita Pd/H_2 referentní elektroda. Elektrodový potenciál 0 V proti Pd/H_2 odpovídá 234 mV proti SCE při pH 7.

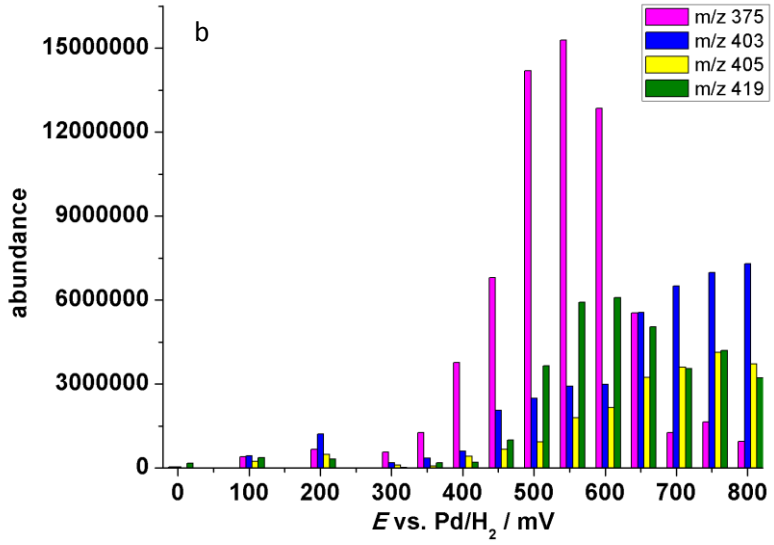


Obr. 26. Hmotnostní voltamogramy ZOP, octanový pufr o pH: a) 3,5; (b) 6,8 a (c) 9,5; 50 % CH_3CN,koncentrace ZOP = 5×10^{-4} mol/l.

Oxidace zopiklonu začala probíhat okolo potenciálu 500 mV proti Pd/H_2. V prostředí octanového pufru pH 9,5 začala oxidace při nižším potenciálu. Na rozdíl od kyselého a neutrálního prostředí, v alkalickém prostředí nebyly pozorovány v hmotnostních spektrech

signály žádných oxidačních produktů, ačkoli došlo k rapidnímu snížení signálu zopiklonu (obr. 26c). Oxidační procesy v kyselém a neutrálním prostředí poskytly stejné hlavní produkty jako v off-line experimentech. Ke zvýšení intenzity signálu produktu P1 došlo při nižším potenciálu než u produktů P2 – P4 (obr. 27). Intenzita signálu rychle dosáhla maxima okolo potenciálu 600 mV a poté rychle klesla. Ke tvorbě ostatních produktů došlo při vyšším potenciálu a změny v intenzitách signálů nebyly tak velké jako v případě produktu P1. Z této skutečnosti můžeme usoudit na rozdílnou chemickou povahu produktu P1 a odlišný proces jeho tvorby oproti produktům P2 – P4. Tento fakt je zřetelný díky tomu, že produkt P1 je vytvořen ztrátou methylové skupiny (do molekuly zopiklonu není vnesen žádný substituent), zatímco ostatní produkty vznikají adicí jednoho nebo dvou atomů kyslíku. Některé oxidační produkty identifikované při elektrochemické oxidaci jsou podobné jako produkty z *in vitro* metabolické přeměny zopiklonu (*N*-demethylovaný zopiklon a zopiklon *N*-oxid) [11].





Obr. 27. Intenzity signálů oxidačních produktů při různých potenciálech při on-line EC/MS zapojení, 50% CH_3CN, octanový pufr a) pH 3,5; b) pH 6,8; koncentrace zopiklonu c = 5×10^{-4} mol/l.

7. Závěr

Cílem této práce bylo prostudovat elektrochemické chování zopiklonu a analyzovat jeho oxidační produkty.

Zopiklon podléhá ireversibilní anodické oxidaci v širokém rozmezí pH. Proudová odezva se zvyšuje s rostoucí hodnotou pH z kyselého do neutrálního prostředí a v alkalickém prostředí zůstává téměř konstantní. V rozmezí pH 2,8 – 5,9 se posouvá potenciál píku do nižších hodnot se směrnicí -59 mV/pH. Z této směrnice vyplývá, že se reakce účastní stejný počet protonů i elektronů. Zdánlivá disociační konstanta pK má v prostředí 50% acetonitrilu hodnotu 5,9.

Ze závislosti proudu píku na rychlosti skenu je vidět značný vliv adsorpce na elektrochemickou oxidaci zopiklonu. Tento vliv se projevil i v experimentu s ponořením čisté elektrody do zásobního roztoku zopiklonu a následnou oxidací ZOP naadsorbovaného na povrchu elektrody v čistém roztoku elektrolytu. Posun potenciálu píku s rostoucí rychlostí skenu odhalil změnu v mechanismu elektrochemické reakce při vyšších rychlostech skenu.

Analýzou vzorků z off-line i on-line elektrolýzy byly identifikovány čtyři hlavní oxidační produkty. Produkt P1 byl identifikován jako *N*-demethyl zopiklon. Tento produkt by nalezen v prostředí octanu amonného pH 3,5 a 6,8. Další tři oxidační produkty byly vytvořeny

zavedením jednoho (produkty P2 a P3) nebo dvou (produkt P4) atomů kyslíku do molekuly zopiklonu. Výsledky této práce potvrzují podobnost mezi elektrochemickou oxidací zopiklonu a jeho metabolizací cytochromem P450.

8. Použitá literatura

1. **Tonon M.A., Jabor V.A.P., Bonato P.S.:** Analytical and Bioanalytical Chemistry 400, (2011) 3517 - 3525.

2. **Tonon M.A., Bonato P.S.:** Electrophoresis 33 (2012) 1606-1612.

3. **Jantos R., Vermeeren A., Sabljic D., Remaekers J.G., Skopp G.:** International Journal of Legal Medicine127 (2013) 69-76.

4. **Bounine J.P., Tardif B., Beltran P., Mazzo D.J.:** Journal of Chromatography A 677 (1994) 87 - 93.

5. **Fernandez C., Gimenez F., Marayrargue I., Thuillier A., Farinotti R.:** Chirality 7 (1995) 267 - 271.

6. **Mannaert E., Tytgat J., Daenens P.:** Journal of Analytical Toxicology 21 (1997) 208 - 212.

7. **El-Shaheny R.N, Alattas A., Nasr J.J., El-Enany N., Belal F.:** Journal of Chromatography B 907 (2012) 49-55.

8. **DobleA., CantonT., MalgourisC., StutzmannJ.M., PiotO., BardoneM.C., PauchetC., BlanchardJ.C.:** European Psychiatry 10 (1995) 117 – 128.

9. http://en.wikipedia.org/wiki/Zopiclone. [Online] staženo 15.3.2015

10. **Gaillot J., Heusse D., Hougton G., Marc Aurele J., Dreyfus J.:** International pharmacopsychiatry (1982) 79 – 81.

11. **BeyquemontL., MouajjahS., EscaffreO., BeauneP., Funkc-BrentanoCH., JaillonP.:** The American Society for Pharmacology and Experinemtal Therapeutics, 27 (1999) 1068 – 1073.

12. **PawB., MisztalG.:** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 23 (2000) 819 – 823.

13. **Fernandez C., Gimenez F., Baune B., Maradeix V., Thuillier A., Farinotti R.:** Journal of Chromatography A 617 (1993)271-278.

14. **Foster R.T., Caillé G., Ngoc A.H., Lemko CH., Kherani R., Pasutto F.M.:** J Chromatography B 658 (1994)161-166.

15. **Gomis D.B., Velasco C.B., Sánchez I.H., Álvarez M.:** Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies 32 (2009) 2654 – 2668.

16. **PushpalathaP., SarinR.K., RaoM.A., BaggiT.R.R.:** Journal of Planar Chromatography 22 (2009) 449 – 451.

17. **Bouklouze A.A., ViréJ.- C., Quarin G.C., Kauffmann J.- M.:** Electroanalysis 6 (1994) 1054 – 1050.

18. **ViréJ.-C., ZhangH., QuarinG., PatriarcheG.J.:** Talanta 40 (1993) 313 – 323.

19. **Nilsson G.H., Kugelberg F.C., Kronstrand R., Ahlner J.:** Forensic Science International, 200 (2010) 130–135.

20. **Hempel G., Blaschke G.:** Journal of Chromatrography B 675(1996)139-146.

21. **Tono M.A., Jabor V.A.P., Bonato P.S.:** Analytical and Bioanalytical Chemistry 405 (2013) 267 – 273.

22. **S., Yilmaz.:** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 71 (2009) 79-83.

23. **Wang J.:** Analytical Electrochemistry, VCH Publishers, New York 2000.

24. **Gupta V.K., Jain R., Radhapyar iK., Jadon N., Agarwa I.S.:** Analytical Biochemistry, 408 (2011) 179 – 196.

25. **Annapoorna S.R., Rao M.P., Sethuram B.:** Journal of Electroanalytical Chemistry 490 (2000) 93 - 97.

26. **Nunez - Vergara L.J., Farias D., Bollo S., Squella J.A.:** Bioelectrochemisty 53 (2001) 103 - 110.

27. **Ye - Mei L., Xiang - Tang C., Jun L., Hui - Hong L.:** Electrochimica Acta 49 (2004) 3195 - 3200.

28. **Angulo G., Kapturkiewicz A., Palmaerts A., Lutsen L., Cleij T.J., Vanderzande D.:** Electrochimica Acta 54 (2009) 1584 - 1588.

29. **Macchi G.:** Journal of Electroanalytical Chemistry 9 (1965) 290 - 298.

30. **Lencastre R.P., Matos C.D., Garrido J., Borges F., Garrido E.M.:** Journal of Food and Drug Analysis 14 (2006) 242 - 251.

31. **Goyal R.N., Gupta V.K., Chatterjee S.:** Analytical Chimica Acta 657 (2010) 147 - 153.

32. Sabry S.M., Barary M.H., Abdel - Hay M.H., Belal T.S.:Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis34 (2004) 509 - 516.

33. **GuoW., LinH., LiuL., SongJ.:** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 34 (2004) 1137 – 1144.

34. **Acuna J.A., de la Fuente C., Vázquez M.D., Tascón M.L., Gómez M.I., Mata F., Sánchez-Batanero P.:** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 29 (2002) 617 - 624.

35. **Dogan B., Ozkan S.A., Uslu B.:** Analytical Letters 38 (2005) 641 - 656.

36. **Tapsbola I., Belgaied J.E., Boujlel K.:** Journal of Pharmacology and Biomedicinal Analysis 34 (2004) 433 - 440.

37. **Uslu B., Demicirgil B.T., Ozkan S.A., Sentruk Z., Aboul-Enein H.Y.:** Pharmazie 56 (2001) 938 - 941.

38. **Bollo S., Nunez-Vergara L.J., Squella J.A.:** Journal of Electroanalytical Chemistry 562 (2004) 9 - 14.

39. **H.E.D., Kara.:** Bioelectrochemistry 99 (2014) 17 - 23.

40. **Wang X., Yang N., Wan Q.:** Electrochimica Acta 52 (2006) 361 - 368.

41. **Santos A.L., Takeuchi R.M., Mariotti M.P., De Oliveira M.F., Zanoni M.V.B., Stradiotto N.R.:** II Farmaco 60 (2005) 671 - 674.

42. **Liu A-L., Zhang Sh-B., Chen W., Huang L-Y., Lin X-H., Xia X-H.:** Talanta 77 (2008) 314 - 318.

43. **Ch., Li.:** Bioelectrochemistry 70 (2007) 263 - 268.

44. **Marken F., Neudeck A., Bond A. M.:** Electroanalytical Methods, Guide to Experiments and Applications (Ed.: Scholz), Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 2002.

45. **Larenas G., Bollo S., Rodriguez M., Lemus I., Nunez-Vergara L.J., Squella J.A., Alvarez-Lueje A.:** Journal of AOAC International 88 (1135 - 1141) 2005.

46. **KontoyannisCh.G., AntimisiarisS.G., DouroumisD.:** Analytica Chimica Acta 391 (1999) 83 – 88.

47. **Altinöz S., Nemutlu E.,Kir S.:** Farmaco 57 (2002) 463 – 468.

48. **Beltagi A.M., Ghoneim M.M., Radi A.:** Journal of Pharmaceutical and Biological Analysis 27 (2002) 795 – 801.

49. **Radi A-E., Ghoneim M., Beltagi A.:** Chemical and Pharmaceutical Bulletin 49 (2001) 15274 – 1260.

50. **Ghoneim M.M, El-Desoky H.S., Abdel-Galei M.M.:** Bioelectrochemistry 80 (2011) 162 – 168.

51. **Baranowska I., Markowski P., Gerle A., Baranowski J.:** Bioelectrochemistry 73 (2008) 5 -10.

52. **Topal B.D., Golcu A., Ozkan S.A.:** Analytical Letters 42 (2009) 689–705.

53. **Mandič Z., Weitner Z., Ilijaš M.:** Journal of Pharmaceutical and Biological Analysis 33 (2003) 647 - 654.

54. **Wahdan T., El-Ghany N.A.:** II Farmaco 60 (2005) 830 - 833.

55. **Uslu B., Dogan B., Özkan S.A.:** Analytica Chimica Acta 537 (2005) 307 - 313.

56. **Demircigil B.T., Özkan S.A., Coruh Ö., Yilmaz S.:** Electroanalysis 2 (2002) 122 - 127.

57. **O.A., Razak.:** Journal of Pharmaceutical nad Biological Analysis 34 (2004) 433 - 440.

58. **Firmio de Oliveira M., Stradiotto N.R.:** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30 (2002) 297 - 284.

59. **El-Ries M.A.N., Mohamed G.G., Attia A.K.:** The Pharmaceutical Society of Japan 128 (2008) 171 – 177.

60. **Torres R.F., Mochón M.C., Sánchez J.C.J., López M.A.B., Pérez A.G.:** Talanta 53 (2001) 1179 - 1185.

61. **Wangfuengkanagul N., Chailapakul O.:** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 28 (2002) 841 – 847.

62. **FanY., LiuJ.-H., LuH.-T., ThangQ.:** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 85 (2011) 289 – 292.

63. **Wang C.Y., Hu X.Y.:** Talanta 67 (2005) 625 - 633.

64. **Lozano-Chaves M.E., Palacios-Santander J.M., Cubillana-Aguilera L.M., Naranjo-Rodríguez I., Hilgado-Hilgado-de-Cisneros J.L.:** Sensors and Actuators B 115 (2006) 575 – 583.

65. **Huang K-J., Xu Ch-X., Xie W-Z.:** Bulletin of the Korean Chemical Society 29 (2008) 988 - 992.

66. **Sun D., Zhang H.:** Microchimica Acta 158 (2007) 131 – 136.

67. **KachoosangiR.T., WildgooseG.G., ComptonR.G.:** Analytica Chimica Acta 618 (2008) 54 – 60.

68. **Kaufmann J.-M., Patriarche G.J., Christian G.D.:** Analytical Letters 12 (1979) 1217 - 1234.

69. **Hernandéz L., Gonzáles E., Hernandéz P.:** Analyst 113 (1988) 1715 - 1718.

70. **Mashhadizadeh M.H., Afshar E.:** Electrochimica Acta 87 (2013) 816 - 823.

71. **Aravagiri M., Marder S.R.:** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 26 (2001) 301 - 311.

72. **Diculescu V.C., Vivan M., Brett A.M.O.:** Electroanalysis 18 (2006) 1800 - 1807.

73. **Rodríguez J., Berzas J.J., Castaneda G., Rodríguez N.:** Talanta 66 (2005) 202 - 209.

74. **Golabchifar A-A., Rouni M-R., Shafaghi B., Rezaee S., Foroumadi A., Khoshayand M-R.:** Talanta 85 (2011) 2320 - 2329.

75. **Gschwind H-P., Pfaar U., Waldemeier F., Zollinger M., Sayer C., Zbiden P., Hayes M., Pokorny R., Seiberling M., Ben-Am M., Peng B., Gross G.:** Drug Metabolism and Deposition 33 (2003) 1503 - 1512.

76. **Permentier H.P., Bruins A.P., Bischoff R.:** Mini Reviews in Medicinal Chemistry 1 (2008) 46 - 56.

77. **Bruckenstein S., Gadde R.R.:** Journal of American Chemical Society 93 (1971) 793–794.

78. **Hambitzer G., Heitbaum J.:** Analytical Chemistry 58 (1986) 1067–1070.

79. **Faber H., Vogel M., Karst U.:** Analytica Chimica Acta 834 (2014) 9 -21.

80. **Lohmann W, Anne Baumann A., Karst U.:** LC-GC Europe (2010) 1 - 7.

81. **Jirovský D., Bartošová Z., Skopalová J.:** Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultas Rerum Naturalis 47 (2007) 22 - 25.

82. **Modestov A.D., Gun J., Savotine I., Lev O.:** Journal of Electroanalytical Chemistry 565 (2004) 7 -19.

83. **Bond A.M., Colton R., D'Agostino A., Downard A.J., Traeger J.C.:** Analytical Chemistry 67 (1995) 1691-1695.

84. **F., Zhou.:** Trends in Analytical Chemistry 24 (2005) 218 - 227.

85. **Chen H., Zhang Y., Mutlib A.E., Zhong M.:** Analytical Chemistry 78 (2006) 2413-2421.

86. **Pretty J.R., Van Berkel J.:** Rapid Communacations in Mass Spectrometry 12 (1998) 1644-1652.

87. **Antoine D.J., Williams D.P., Park B.K.:** Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology 4 (2008) 1415–1427.

88. **Liebler D.C., Guengerich F.P.:** Nature Reviews Drug Discovery 4 (2005) 410–420.

89. **Meyer U.A.:** Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics 24 (1996) 449–459.

90. **Park B.K., Kitteringham N.R., Maggs J.L., Pirmohamed M., Williams D.P.:** Annual Review of Pharmacology and Toxicology 45 (2005) 177–202.

91. **Jahn S., Seiwert B., Kretzing S., Abraham G., Regenthal R., Karst U.:** Analytica Chimica Acta 756 (2012) 60 - 72.

92. **Baumann A., Lohmann W., Schubert B., Oberacher H., Karst U.:** Journal of Chromatography A 1216 (2009) 3192 - 3198.

93. **Lohmann W., Dötzer R., Gůutter G., Van Leeuven S.M., Karst U.:** Journal of America Mass Spectrometry 20 (2009) 138 - 145.

95. **Van Leeuwen S.M., Blankert B., Kauffmann J.M., Karst U**.: Analytical and Bioanalytical Chemistry 383 (2005) 742 - 750

96. **Hermansson J., Glaumann H., Karlen B., Von Bahr C.:** Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) 49 (1980) 326

97. **Li X-Q., Bjorkman A., Andersson T.B., Riddestrom M., Masimirembwa C.M.:** The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 300 (2002) 399

98 **Patterson L.H., Hall G., Nijjar B.S., Khatra P.K., Cowan D.A.:** J. Pharm. Pharmacol 38 (1986) 326

99. **Hrbac J, Halouzka V, Trnkova L, Vacek J.:** Sensors 14 (2014) 13943-13954.

100. www.drugbank.com. [Online] staženo 20.4.2015

101. **Smyth W.F., Joyce C., Ramachandran V.N., O'Kane E., Coulter D.:** Analytica Chimica Acta 506 (2004) 203 - 214.

102. **Johansson T., Weidolf L., Jurva U.:** Rapid Communications in Mass Spectrometry 21 (2007) 2323 - 2331.