

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Prírodovedecká fakulta

Katedra analytickej chémie

**Využitie spojenia elektrochémie s hmotnostnou spektrometriou  
pre štúdium premeny biologicky aktívnych látok**

DIPLOMOVÁ PRÁCA

|                   |                             |
|-------------------|-----------------------------|
| Autor:            | Jana Macúchová              |
| Vedúci práce :    | RNDr. Jana Skopalová, Ph.D. |
| Študijný program: | N 1407 Chémia               |
| Študijný obor:    | Analytická chémia           |
| Forma štúdia:     | Prezenčná                   |

Olomouc 2018

# Bibliografická identifikácia

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| <b>Meno a priezvisko autora</b> | Jana Macúchová  |
| <b>Názov práce</b>              | Využitie spojenia elektrochémie s hmotnostnou spektrometriou pre štúdium premeny biologicky aktívnych látok   |
| <b>Typ práce</b>                | Diplomová práca   |
| <b>Pracovisko</b>               | Katedra analytickej chémie  |
| <b>Vedúci práce</b>             | RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.   |
| <b>Rok obhajoby</b>             | 2018  |
| <b>Abstrakt</b>                 | <p>V tejto diplomovej práci je popísané elektrochemické správanie 1,3-benzodioxolu a jeho derivátov. Boli zvolené deriváty 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-methylmethanamín, a syntetický kanabinoid JTE 907. Elektrochemické správanie bolo skúmané pomocou cyklickej a diferenčne pulznej voltametrie. Výsledky ukazujú, že elektrochemická oxidácia 1,3-benzodioxolu a jeho derivátov vo vodných roztokoch je zložitý ireverzibilný proces komplikovaný adsorpciou na povrch elektródy a elektropolymeráciou. Produkty elektrochemickej oxidácie 1,3-benzodioxolu a jeho derivátov analyzovaných hmotnostnou spektrometriou vykazovali benzochinónové štruktúrne usporiadanie. U samotného 1,3-benzodioxolu boli detegované i produkty s dimérou katecholovou štruktúrou.</p> |

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <b>Kľúčové slová</b>      | 1,3-benzodioxol, deriváty 1,3-benzodioxolu, elektrochemická oxidácia, hmotnostná spektrometria |
| <b>Počet strán</b>        | 49   |
| <b>Počet strán príloh</b> | 10   |
| <b>Jazyk</b>              | Slovenčina   |

# Bibliographical identification

|  |  |
|--|--|
| <b>Author's first name and surname</b> | Jana Macúchová   |
| <b>Title</b>                           | Application of electrochemistry/mass spectrometry for the study of transformation of biologically active substances  |
| <b>Type of thesis</b>                  | Master diploma thesis  |
| <b>Department</b>                      | Department of Analytical Chemistry   |
| <b>Supervisor</b>                      | RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.  |
| <b>The year of presentation</b>        | 2018   |
| <b>Abstract</b>                        | <p>Electrochemical behavior of 1,3-benzodioxole and its derivatives 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-<i>N</i>-methylmethanamine and a synthetic cannabinoid JTE 907 was studied in this diploma thesis. Cyclic and differential pulse voltammetry were used for the purpose. The results show that the electrochemical oxidation of 1,3-benzodioxol and its derivatives in aqueous solutions is a complex irreversible process complicated by adsorption on the electrode surface and electropolymerization. Products of the bulk electrochemical oxidation of 1,3-benzodioxole and its derivatives analyzed by mass spectrometry exhibited a benzoquinone structure. Products with a dimeric catechol structure were also detected in the case of 1,3-benzodioxole.</p> |
| <b>Keywords</b>                        | 1,3-benzodioxole, derivatives of 1,3-benzodioxole, electrochemical oxidation, mass spectrometry  |

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| <b>Number of pages</b>                | 49     |
| <b>Number of pages of appendicies</b> | 10     |
| <b>Language</b>                       | Slovak |

## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že diplomovú prácu som vypracovala samostatne za pomoci citovanej literatúry a uvedených zdrojov pod vedením RNDr. Jany Skopalovej.

V Olomouci, 20.4. 2018

.....

Podpis

## **Pod'akovanie**

Chcela by som predovšetkým pod'akovať RNDr. Jane Skopalovej za trpezlivosť, cenné rady, literatúru, pripomienky, pomoc a čas, ktorý mi venovala pri vedení mojej diplomovej práce.

# OBSAH

|   |    |
|---|----|
| 1. ÚVOD .....   | 1  |
| 2. TEORETICKÁ ČASŤ .....  | 2  |
| 2.1 Drogy .....   | 2  |
| 2.2 „Designer drugs“ .....  | 2  |
| 2.3 JTE 907 .....   | 5  |
| 2.4 MDMA .....  | 5  |
| 3. Biologicky aktívne látky .....   | 12 |
| 3.1 Alkaloidy .....   | 13 |
| 3.2 Benzodioxol .....   | 14 |
| 4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....  | 16 |
| 4.1 Chemikálie .....  | 16 |
| 4.2 Prístrojové vybavenie .....   | 16 |
| 4.3 Pracovné postupy .....  | 17 |
| 4.3.1 Príprava elektródy pred meraním .....   | 17 |
| 4.3.2 Príprava zásobných roztokov .....   | 17 |
| 4.3.3 Cyklická voltametria – závislosť na rýchlosti skenu .....                           | 17 |
| 4.3.4 Cyklická voltametria/ diferenčne pulzná voltametria – závislosť na pH .....         | 18 |
| 4.3.5 Diferenčne pulzná voltametria – kalibračná závislosť .....                          | 20 |
| 4.3.6 Elektropolymerácia .....  | 20 |
| 4.3.7 Potenciostatická elektrolýza a analýza pomocou hmotnostej spektrometrie .....       | 21 |
| 5. VÝSLEDKY A DISKUSIA .....  | 22 |
| 5.1 Cyklická voltametria – závislosť na rýchlosti skenu .....                             | 22 |
| 5.2 Cyklická voltametria/ diferenčne pulzná voltametria – závislosť na pH .....           | 26 |
| 5.3 Diferenčne pulzná voltametria – kalibračná závislosť .....                            | 33 |
| 5.4 Elektropolymerácia .....  | 35 |
| 5.5 Potenciostatická elektrolýza a analýza pomocou hmotnostej spektrometrie .....         | 37 |
| 6. ZÁVER .....  | 44 |
| 7. POUŽITÁ LITERATÚRA .....   | 45 |
| 8. PRÍLOHY .....  | 50 |
| Príloha 1: Hmotnostné spektrá 1,3-benzodioxolu .....                                      | 50 |
| Príloha 2: Hmotnostné spektrá 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)- <i>N</i> -metylmetylanamínu ..... | 53 |
| Príloha 3: Hmotnostné spektrá látky JTE 907 .....   | 57 |

## ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

|       |   |
|-------|---|
| MDMA  | 3,4-metyléndioxyamfetamín                                     |
| THC   | tetrahydrogestrinón   |
| MDA   | 3,4-metyléndioxyamfetamín                                     |
| HHMA  | 3,4-dihydroxymetamfetamín                                     |
| HMMA  | 4-hydroxy-3-metamfetamín                                      |
| HMA   | 3,4-dihydroxyamfetamín  |
| GC/MS | spojenie plynovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou |
| CE    | kapilárna elektroforéza                                       |
| TLC   | chromatografia na tenkej vrstve                               |
| HPLC  | vysokoúčinná kvapalinová chromatografia                       |
| CV    | cyklická voltametria  |
| DPV   | diferenčne pulzná voltametria                                 |
| SWV   | square wave voltametria                                       |
| MA    | metamfetamín  |



# 1.ÚVOD

Látka 1,3-benzodioxol nie je veľmi dôležitá, ale jeho benzénový kruh substituovaný metyléndioxy funkčnou skupinou je dôležitou súčasťou alkaloidov a liečív. Najväčšie zastúpenie má v prírodných látkach, ktoré majú rôzne účinky na organizmus, ale benzodioxolový kruh sa nachádza i v návykových látkach či už prírodného alebo syntetického pôvodu - napr. v štruktúre rekreačných drog ako je extáza, v syntetických látkach ako sú kanabionoidy, syntetické katinóny a v prírodných látkach ako je sesamol (sézam).

Hoci elektrochemická aktivita látok s benzodioxolovým motívom je známa a sú popísané postupy napríklad pre voltametrické stanovenie extázy, elektrochemické chovanie 1,3-benzodioxolu a jeho derivátov nebolo doposiaľ systematicky študované a nie je popísané v dostupnej odbornej literatúre. Je známe, že elektrochemická aktivita úzko súvisí s biologickou aktivitou a rada metabolických enzýmových reakcií môže byť stimulovaná v jednoduchom elektrochemickom systéme.[1] Znalosť elektrochemických vlastností látok môže teda prispieť k objasnení biologických procesov prebiehajúcich v živých organizmoch, prípadne odhaliť reaktívne medziprodukty redoxných premien, ktoré by mohli mať toxické účinky na organizmus.

Preto bolo cieľom tejto práce pomocou analytických metód popísať elektrochemické správanie 1,3-benzodioxolu a jeho derivátov 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylanamínu a syntetického kanabinoиду JTE 907. Boli k tomu využité – metódy cyklickej voltametrie a diferenčne pulznej voltametrie s elektródou zo skelného uhlíku. Potenciostatickou elektrolýzou bol 1,3-benzodioxol a jeho deriváty oxidovaný a následne vzniknuté oxidačné produkty boli analyzované pomocou hmotnostnej spektrometrie.

## 2. TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Drogy

Droga nie je slovo moderného sveta. Toto slovo, používané od dávnych čias, sprevádzalo ľudstvo pod pojmom liečivo takmer vo všetkých kultúrach. Liečivo, alebo teda droga, je akákoľvek látka, ktorá pri podaní – či už vdýchnutím, užitím alebo vstrebávaním cez kožu, určitým spôsobom prináša dočasnú fyziologickú, ale aj psychickú úľavu.[2] Látky, ktoré spôsobujú prostredníctvom centrálnej nervovej sústavy zmeny duševného prežívania sú psychoaktívne látky. Zaraduje sa sem alkohol, nikotín i kofeín, ktoré sú zároveň i najznámejšími tzv. rekreačnými drogami.[3] Medzi ďalšie rekreačné drogy patria amfetamíny, metamfetamíny, kanabinoidy – marihuana a hašiš a mnoho ďalších látok, ktoré sa užívajú najmä na spoločenských akciách, či už medzi priateľmi alebo v prostredí barov so zámerom zabaviť sa.[4-5]

Drogy sa delia z niekoľkých hľadísk a to napr. z hľadiska zákona či podľa rizika spojeného s ich užitím (tvrdé a mäkké) a vzniku. Delenie drog z hľadiska zákona: rozoznáva drogy – legálne, čiže tie drogy, ktoré sú ľahko dostupné, ako napr. byliny, liečivá, alkohol, prírodné opiáty a mnoho ďalších. Výroba, distribúcia, predaj či prechovávanie takýchto látok nie je trestne postihnuteľné. Nelegálnymi drogami sú kanabinoidy, halucinogény, stimulanty a iné látky, ktorých výroba, predaj alebo šírenie a prechovávanie v akejkoľvek množstve je trestne stíhané, avšak samotné užívanie týchto drog nie je trestné.[6] Niektoré drogy majú prírodný charakter, nemusia sa chemicky upravovať a môžu sa ihneď užívať – patria sem rôzne huby ako lysohlávky, kanabis, durman, atď. Ďalej existuje skupina drog, ktoré majú účinné látky extrahované z rastlinného materiálu, ale sú spracovávané pomocou chemikálií napr. heroín – takéto drogy sú polysyntetické. Poslednou skupinou sú drogy syntetické, ktoré sa vyrábajú výlučne chemickou cestou a pôvodne sú určené na iné účely – napr. toluén či okená. Patrí sem však i LSD, či deriváty amfetamínu.[7]

### 2.2 „Designer drugs“

Tzv. designer drugs sú látky, ktoré svojou štruktúrou a funkčnými skupinami napodobňujú farmakologické účinky nezákonného lieku tak, aby spadali do klasifikácie legálnych látok. Niektoré lieky boli pôvodne syntetizované, aby deriváty pôvodného liečiva boli účinnejšie a mali minimálne vedľajšie účinky. Avšak časom boli zneužitú a používali sa ako príležitostné – rekreačné drogy.[8] Medzi designer drug patria bežne zneužívané látky ako je kokain, LSD, kanabinoidy, metamfetamín či deriváty amfetamínu ako je extáza.[9-10].

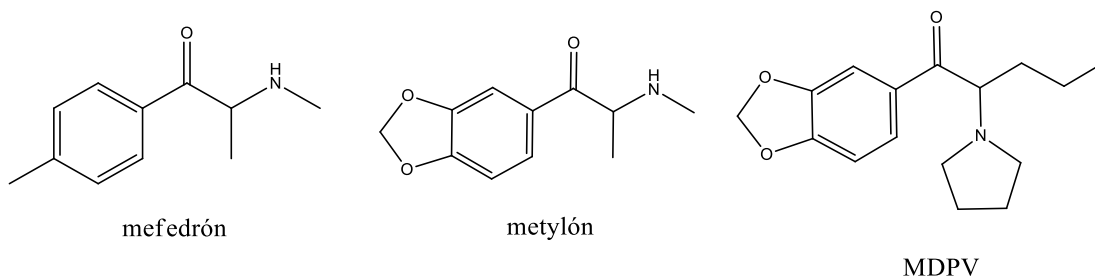
Tieto produkty sa predávajú na tzv. čiernych trhoch, maloobchodných predajniach či cez internetové e-shopy. V Českej republike sa tieto syntetické látky predávali v tzv. Amsterdam shopoch, kde boli tieto ponúkané ako zberateľské predmety a tým mohli byť legálne ponúkané.[11]

Už od začiatku 19. storočia sú známe príklady syntetických drog. Už od dávnych čias ľudia poznali liečivú rastlinu – mak siaty, ktorý sa pestuje po celom svete na výrobu farmaceutických opiátov. Extrakciou ópia z maku a jeho následnou chemickou úpravou sa získal derivát alkaloidu morfinu – heroín.[12] Neskôr sa rozšírilo používanie nových anabolických steroidov – ako je tetrahydrogestrinón (THG) populárny medzi športovcami, pretože nebol štandardnými testami preukázateľný.[13] V posledných rokoch došlo k rastúcemu záujmu a využívaniu syntetických katinónov známych ako „Bath salts“. Ďalej sú to nebezpečné látky napodobňujúce kokaín, LSD, MDMA atď. známe pod názvom napr. „Purple Wave“, „Vanilla Sky“. Väčšina týchto drog sa predáva ako bylinné prísady, čistiace prostriedky na šperky či rastlinné produkty označené nálepkou „nie sú určené na konzumáciu“. Do rastlinného materiálu sú pridávané syntetické produkty, ktoré sú upravené rôznymi psychoaktívnymi látkami, majú napodobniť aktívnu zložku tetrahydrokanabinol (THC) nachádzajúci sa v marihuane. K dispozícii sú pod značkami „Spice“, „K2“ atď. [11]

### **2.2.1 Bath salts**

Syntetické katinóny sú  $\beta$ -ketofetamíny odvodené od prírodného katinónu pochádzajúceho z khat rastliny.[14] Vyrábajú sa vo východnej Ázii a ich distribúcia sa rozšírila po celom svete. Predávajú sa vo forme prášku stlačenom v želatínových kapsulách. Tieto syntetické látky sa zneužívajú najmä kvôli bdelosti a aby sa dostavil pocit eufórie. S týmto nabadeným stavom však súvisia i negatívne stránky ako je zmätenosť, agresívne a násilné správanie. Avšak látky neovplyvňujú len myseľ, ale i fyzické zmeny ako napr. zrýchlený tep srdca, hypertenzia, škripanie zubami, nadmerné potenie, paranoja či halucinácie. Účinky sú podobné ako u 3,4-metyléndioxy-*N*-metylamfetamínu (MDMA), kokaínu či metamfetamínu.[15] Forenznou analýzou bath salts produktov bola preukázaná prítomnosť troch hlavných syntetických katinónov: 4-metyl-*N*-metylkatinón (mefedrón), 3,4-metyléndioxy-*N*-metylkatinón (metylón) a 3,4-metyléndioxypyrovalerón (MDPV) (Obr.1).[16] Metylón a MDPV majú benzodioxolový kruh ako má ilegálna látka MDMA. Metabolizmus MDPV je podobný ako u MDMA. MDPV sa metabolizuje *O*-demetyláciou, čím sa produkujú metabolity 3,4-dihydroxypyrovalerón a 4-hydroxy-3-metoxypyrovalerón.,

ktorý je stálejší a môže byť užitočný pre ďalšie forenzné účely pri stanovení MDPV u ľudí.[17-18]



**Obr. 1:** Syntetické katinóny

### 2.2.2 Spice a K2

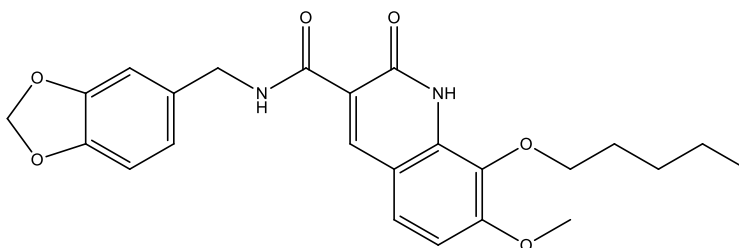
Spice a K2 patria do skupiny syntetických drog, ktoré majú za úlohu napodobniť hlavnú zložku marihuany – THC. Prevažne sa vyrábajú v Ázii a sú distribuované najmä do USA. Predávajú sa vo forme bylinných esencií, ktoré sú určené predovšetkým na fajčenie, ale môže byť aj vo forme kvapaliny a používajú sa ako náplň do elektronických cigariet. Tieto návykové látky spôsobujú pri užívaní halucinácie, násilné správanie a paranoju. Medzi telesné prejavy patrí zvýšená srdcová činnosť, hypertenzia, necitlivosť a pri nadmernom užití i bezvedomie. Pri predávkovaní a pravidelnom užívaní môže dôjsť ku zlyhaniu obličiek a dokonca až k zlyhaniu srdca.[15]

Užitie kanabinoidov ovplyvňuje a i aktivuje endokanabinoidný systém, ktorý sa skladá z receptorov CB<sub>1</sub> a CB<sub>2</sub>, endokanabinoidov, enzýmov syntézy a enzýmov degradácie. Primárnou funkciou tohto systému je udržanie homeostázy organizmu a zbavovanie tela stresu. Ďalej prispieva na celý rad fyziologických a patologických procesov – ako napr. chuť do jedla, vnímanie bolesti, či znižovanie krvného tlaku a regulácia telesnej teploty. CB<sub>1</sub> receptory sú exprimované najmä v centrálnej nervovej sústave, ale boli nájdené v menšom množstve v periférnych orgánoch ako je slezina, žalúdok, tukové tkanivo, atď. CB<sub>2</sub> sú prítomné prevažne v imunitnom systéme človeka. Oba receptory patria do skupiny G – receptorov reagujúcich na proteín obsiahnutých v kanabinoidoch. Aktiváciou týchto receptorov dochádza k dráždivosti neurónov.[19] Ligandy viažuce sa na kanabinoidné receptory sa delia do troch skupín: prírodné kanabinoidy (rastliny), endokanabinoidy (endogénne kanabinoidy) a syntetické kanabinoidy.[20] Syntetické kanabinoidy majú sedem hlavných štruktúrnych skupín: naftoylindoly, naftylmetylindoly, naftylpyroly,

naftylmetylindény, fenylacetylindoly, cyklohexylfenoly a klasické kanabinoidy. Tieto deriváty indolu majú najlepšiu afinitu k receptoru CB<sub>1</sub>. [21]

### 2.3 JTE 907

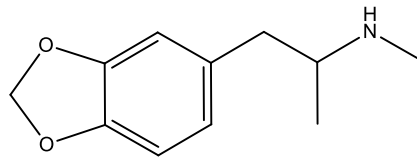
*N*-(1,3-benzodioxol-5-yl-metyl)-7-metoxy-2-oxo-8-pentyloxy-1,2-dihydrochinolín-3-karboxamid iným názvom JTE 907 (Obr. 2) patrí medzi selektívne kanabinoidné agonisty receptoru CB<sub>1</sub> a CB<sub>2</sub> endokanabinoidného systému s vyššou afinitou k CB<sub>2</sub> receptoru. Táto syntetická látka má pravdepodobne protizápalové a antialergické účinky. [22-23]



**Obr. 2:** Štruktúra syntetického kanabinoidu JTE 907

### 2.4 MDMA

MDMA (3,4-metyléndioxymetamfetamín) patrí do skupiny amfetamínov, avšak je známa pod názvom extáza. Táto syntetická chemikália obsahuje benzodioxolový kruh (Obr 3.) Je to chirálna látka, ktorá sa vyskytuje v racemickej zmesi (*R*-, *S*-MDMA) pričom (*S*) – MDMA má väčšie psychoaktívne účinky. MDMA pochádza z USA a je nelegálne distribuovaná pašovaním cez hranice štátov. Väčšinou sa predáva v práškovej podobe vo forme tabliet, ktoré majú rôzne farby, logá, značky a často sú zamieňané s cukríkmi (Obr. 4). Táto droga sa podáva v nočných kluboch, preto je považovaná za „party drogu“. MDMA postihuje mozgové bunky a ovplyvňuje úlohu serotonínu. Hlavnou úlohou MDMA je nabudiť pocit eufórie, empatie, zvyšuje citlivosť pre dotyk, podporuje zvýšenie libida atď. Avšak tieto pocity sú spojené aj s nežiadúcimi účinkami ako sú zmätenosť, úzkosť, depresia, poruchy spánku, čo môže viesť k závislosti. Medzi fyzické prejavy patrí zvýšená fyzická aktivita, bdelosť, zvýšená srdcová frekvencia, škripanie zubami, triašky atď. Pri predávkovaní môže dochádzať k prudkému zvýšeniu teploty, čo môže viesť k poškodeniu pečene, obličiek či zlyhaniu srdca. MDMA je distribuovaná ako extáza, ktorá obsahuje ďalšie škodlivé látky ako je metamfetamín, kokaín, kofeín a mnoho ďalších. Okrem toho, podobné látky ako MDA (3,4-metyléndioxyamfetamín) alebo PMA (para-metoxiamfetamín,) sa často predávajú ako extáza, ale nemajú taký účinok ako MDMA, preto dochádza k predávkovaniu. [15]



MDMA

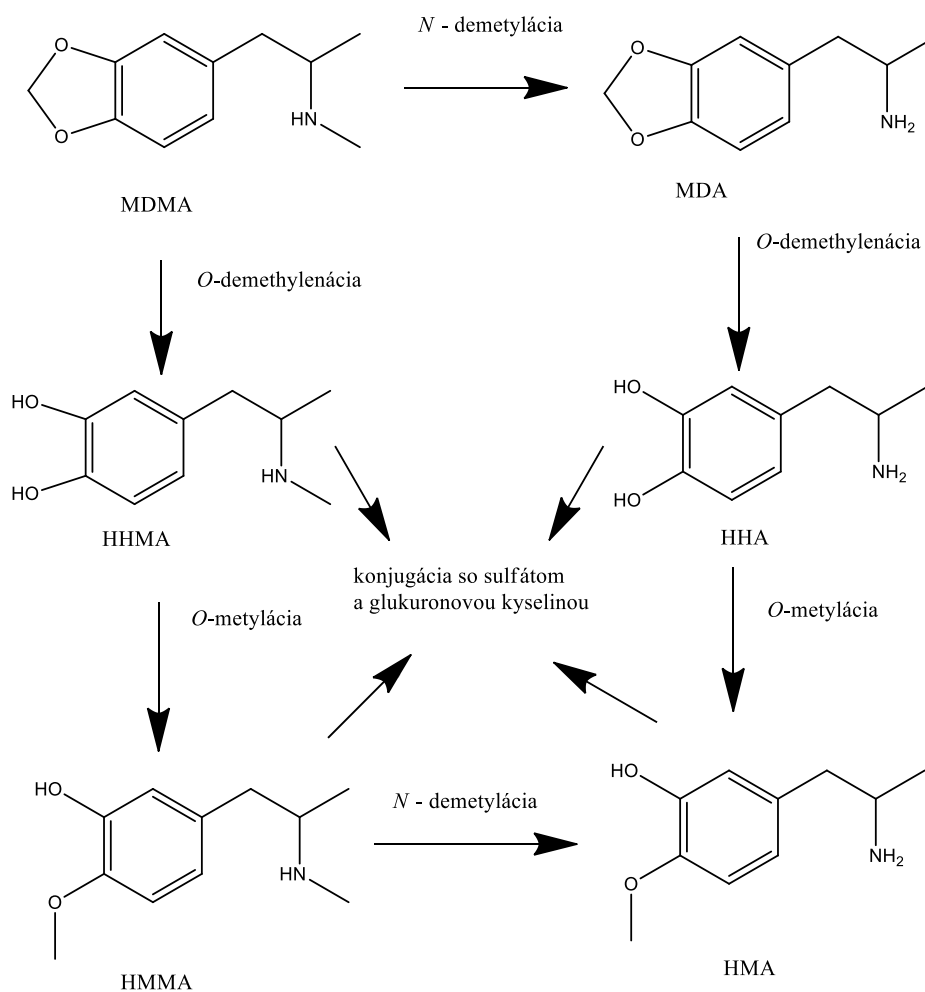
**Obr. 3:** Štruktúra MDMA



**Obr. 4:** Farebné tablety MDMA, obrázok prevzatý [15]

#### 2.4.1 MDMA metabolizmus

Metabolizmus MDMA je sprostredkovaný rôznymi enzýmami napr. enzýmom zo skupiny cytochrómov (cytochróm P450, označenie CYP2D6) a enzým katechol-*O*-metyltransferázy (označenie COMT). Ďalej pokračuje dvoma hlavnými cestami, ktoré fungujú rovnako, ale rôznymi rýchlosťami (Schéma 1). Pre ľudí je dominantná prvá fáza, ktorá zahŕňa *O*-demetylenáciu na 3,4-dihydroxymetamfetamín (HHMA) za katalýzy CYP2D6, nasleduje *O*-metylácia na 4-hydroxy-3-metoxymetamfetamín (HMMA), kde ako katalyzátor pôsobí enzým COMT. U oboch produktov dochádza ku konjugácii s kyselinou glukurónovou alebo sulfátom. Druhá fáza zahŕňa počiatočnú *N*-demetyláciu na MDA a nasleduje buď deaminácia, oxidácia na kyselinu benzoovú a konjugácia s glycinom alebo alternatívnou cestou je *O*-demetylenácia na 3,4-dihydroxyamfetamín (HHA) katalyzovaná CYP2D6 a *O*-metylácia na 4-hydroxy-3-metoxyamfetamín (HMA) za katalýzy enzýmom COMT a môže dochádzať ku konjugácii so sulfátom alebo kyselinou glukurónovou. [24-25-26]



**Schéma 1:** metabolizmus MDMA a MDA [26]

#### 2.4.2 MDMA stanovenie pomocou GC/MS a CE

V článku od *Pizarro et. al.* boli biologické vzorky krv a moč podrobené testu na amfetamín a syntetické látky. Krv bola odoberaná každých 15 minút po dobu 90 minút pred podaním drogy a každé dve hodiny po podaní drogy. Následne sa krv centrifugovala pri 1100 x g počas 10 minút, plazma bola prenesená do skúmaviek a uchovaná v mrazničke. Moč bol odoberatý pred a po podaní látky každé 2 hodiny a uchovaný v mrazničke. Pred stanovením boli vzorky upravené nasledovne: 100  $\mu$ l plazmy alebo moču bolo zmiešaných s 900  $\mu$ l vzorky pred užitím MDMA. Hodnota pH bola upravená na pH 5 pridaním 1 ml 1,1 mol/l acetátového pufru (pH 5,2). Následne sa pridalo 50  $\mu$ l  $\beta$ -glukuronidázy do každej vzorky a potom sa vzorky inkubovali a pretrepávali vo vodnom kúpeli počas 16 hodín pri 37°C. Vzorky analyzované pomocou GC/S boli upravené extrakciou pevná látka – kvapalina. Elúcia analytu bola prevedená 2 ml etylacetátu (2% hydroxid amóony). Trifluoracylové deriváty boli vytvorené reakciou s MBFTA ako derivatizačným činidlom. Pri použití techniky kapilárnej elektroforézy, bol použitý len

extrakčný krok. Štandardy MDMA, MDA, HMMA, HMA boli pripravené o koncentrácii 1 mg na 1 ml metanolu. Zo zásobného roztoku bola pripravená kalibračná rada 10 – 100 µg/ml.

Pre analýzu sa použil plynový chromatograf v spojení s hmotnostnou spektrometriou s kvadrupólovým analyzátorom. Sepáracia MDMA, MDA, HMMA, HMA a ich interných štandardov bola uskutočnená na 5% fenylmetylsiloxanovej kapilárnej kolóne (12 m x 0,2 mm, 0,3 µm). Ako nosný plyn bolo použité hélium pri prietokovej rýchlosti 1,2 ml/min. Plynový chromatograf bol udržiavaný na teplote 70°C po dobu 2 minút, potom sa teplota menila v nasledujúcom programe: do 160°C sa zvyšovala po 30°C/min, na 170°C po 5°C/min, po 15°C/min na teplotu 200°C a posledné zvýšenie bolo po 30°C/min na teplotu 280°C. Teplota nástreku bola 280°C. Ionizačnou technikou u MS bola elektrónová ionizácia (70 eV) a zvolený režim bol SIM.

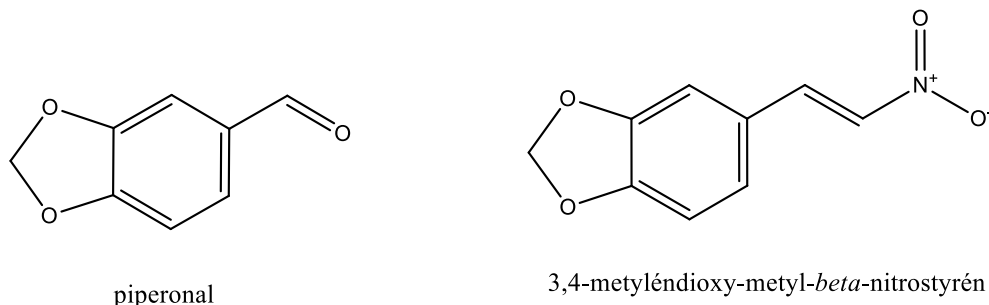
Pre kapilárnu elektroforézu boli použité enantioméry pre štúdium MDMA, MDA a HMMA. MDPA sa použil ako interný štandard pre MDMA, MDA a kodeín pre HMMA. Separácia prebehla v kapiláre z taveného oxidu kremičitého s dĺžkou 48,5 cm. Bolo aplikované konštantné napätie 30 kV. Teplota nástreku sa udržiavala na 15°C. Ako detektor bolo použité diódové pole pri vlnovej dĺžke 204 nm. Nástrek vzorky bol pod tlakom 50 mbar po dobu 2 sekúnd. Použité boli rôzne koncentrácie (2-hydroxy)-propyl-*p*-cyklodextrínu (10 a 50 mmol/l v 50 mmol/l H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> o pH 2,5) ako chirálneho selektoru pre chirálnu separáciu látok. MDMA a MDA enantioméry sa oddelili už pri koncentrácii 10 mmol/l cyklodextrínu, zatiaľ čo HMMA enantioméry sa oddelili pri 50 mmol/l. [27]

#### **2.4.3 MDMA stanovenie pomocou TLC, voltametrie a Ramanovej spektroskopie**

Analyzovanými vzorkami bola MDMA a jej syntetické prekurzory MDA, 3,4-metyléndioxybenzaldehyd (piperonal, Obr. 5) a 3,4-metyléndioxy-metyl-β-nitrostyrén (Obr. 5). Analytické stanovenie bolo prevedené metódou chromatografie na tenkej vrstve (TLC). Stacionárnou fázou bol silikagel 60 F254 (0,2 mm hrúbka vrstvy) a mobilná fáza mala rôzne zloženie: petroléter/ dietyléter/ kyselina mravčia v pomere 5:5:0,1; chloroform / metanol/ kyselina mravčia v pomere (7:3:0,1); chloroform/ acetón/ kyselina mravčia v pomere (8:2:0,1). Škvryny boli vizualizované pomocou jódoých pár a UV detekciou pri vlnovej dĺžke 254 a 366 nm. Čistota produktov bola overená použitím vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s UV detekciou pri 280 nm. Separácia prebehla



na kolóne Nucleosil RP-18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m). Použitá mobilná fáza bola zložená z fosfátového pufru o pH 3 spolu s metanolom (pomer 6:1) za izokratických podmienok s prietokom 1,2 ml/min.



**Obr. 5:** Štruktúry piperonalu a 3,4-metyléndioxy-metyl- $\beta$ -nitrostyrénu

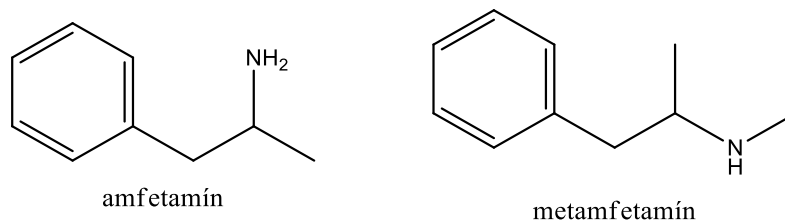
Na elektrochemické meranie bol použitý zásobný roztok látok MDMA, MDA, piperonalu a 3,4-metyléndioxy-metyl- $\beta$ -nitrostyrénu o koncentrácii 10 mmol/l. Príslušné množstvo danej látky bolo rozpustené vo vode alebo etanole, čo záviselo od jej rozpustnosti. Voltametrický roztok bol pripravený zriedením zásobného roztoku na 0,1 mmol/l v objeme 10 ml elektrolytu. Elektrolyt pozostával z 6,2 ml 0,2 mol/l hydrogénfosforečnanu draselného a 43,8 ml 0,2M dihydrogénfosforečnanu draselného na 100 ml roztoku. Pracovalo sa v trojelektrodovom zapojení – pracovná elektróda bola elektróda zo skelného uhlíku (GCE), referenčná elektróda bola argenchloridová (Ag/AgCl) spolu s platinovou pomocnou elektródou. Pracovná elektróda bola manuálne leštená pomocou roztoku aluminy. Meranie prebiehalo na prístroji Autolab PGSTAT 12 potenciostat/galvanostat. Použitými metódami boli cyklická voltametria a diferečne pulzná voltametria. MDMA poskytovala dva anodické píky, prvý pri potenciáli 1,05 V, ktorý je pravdepodobne dôsledkom odstránenia jedného elektrónu z aromatického jadra. Druhý pík je pri potenciáli 1,26 V, ktorý zodpovedá oxidácii sekundárneho amínu v MDMA. Pre syntetické prekurzory MDA, piperonalu a 3,4-metyléndioxy-metyl-nitrostyrénu bol pozorovaný iba jeden pík približne pri potenciáli 1,06 V.

V Ramanovej spektroskopii bol použitý trojitý monochromátor s holografickou mriežkou s počtom vrypov 1800  $\text{mm}^{-1}$ , detektorom bol CCD (Charged Couple Devices). Vstupná štrbina bola nastavená na 200  $\mu\text{m}$  a výstupná štrbina bola otvorená na 14 mm. Na excitáciu slúži argónový laser. Vzorky boli uzavreté v kapilárnych tubách s vnútorným priemerom 0,8 mm. Boli registrované Ramanové pásy pri vlnócte 836/861  $\text{cm}^{-1}$  (deformácia  $\text{CH}_2$  v rovine), 985 – 965  $\text{cm}^{-1}$  (kolísavá vibrácia  $\text{NH}_3$ ), 1024  $\text{cm}^{-1}$  (deformácia aromatického

kruhu), 1310/1319  $\text{cm}^{-1}$  (deformácia  $\text{NH}_2$  v rovine) a 1355  $\text{cm}^{-1}$  pre  $\text{NH}_3$  skupinu. MDMA predstavuje charakteristické signály 381 – 479  $\text{cm}^{-1}$  (väzba CCC, CCN, COC mimorovinná deformácia), 855  $\text{cm}^{-1}$  (kolísavá vibrácia  $\text{NH}_2$ ), 888/ 1040/ 1081  $\text{cm}^{-1}$  (kolísavá vibrácia metylovej skupiny na N), 1199  $\text{cm}^{-1}$  (krúťivá vibrácie  $\text{NH}_2$ ), 1443  $\text{cm}^{-1}$  (krúťivá vibrácia  $\text{NH}_2$ ). Piperonal a 3,4-metyléndioxy-metyl- $\beta$ -nitrostyrén boli odlišené signálmi pri 1445  $\text{cm}^{-1}$  (deformácia aldehydu), 1647  $\text{cm}^{-1}$  (vibrácia C=C) typické pre piperonal, 1316  $\text{cm}^{-1}$  (symetrická valenčná vibrácia  $\text{NO}_2$ ) a 1672  $\text{cm}^{-1}$  (vibrácia C=O) charakteristická pre 3,4-metyléndioxy- $\beta$ -metyl- $\beta$ -nitrostyrén.[28]

#### 2.4.4 MDMA stanovenie elektrochemicky a metódou HPLC

Zásobné roztoky amfetamínu (A, Obr. 6), metamfetamínu (MA, Obr. 6), MDA a MDMA (2,5 mmol/l) boli pripravené v deionizovanej vode. Tablety MDMA boli homogenizované a príslušná navážka na koncentráciu 2,5 mmol/l bola rozpustená v deionizovanej vode. Vzorky ľudského séra boli odobraté a obohatené o MDMA a zriedené na koncentráciu 2,5 mmol/l. Zmes sa spracovala so 0,4 ml metanolu a činidlom na zrážanie a výsledná zmes mala objem 1,5 ml. Počas 5 minút boli skúmavky intenzívne miešané a následne centrifugované 10 min pri 4000 otáčok/min. Elektrochemické stanovenie bolo prevedené na prístroji Autolab PGSTAT 12 potenciostat/galvanostat v trojelektrodovom zapojení – pracovná elektróda bola elektróda zo skelného uhlíku (GCE), referenčná elektróda argentchloridová (KCl, Ag/AgCl) spolu s platinovou pomocnou elektródou. Povrch pracovnej elektródy bola manuálne leštený pomocou roztoku aluminy. Merania boli prevedené za laboratórnej teploty. Na meranie bola použitá metóda cyklickej voltametrie (CV), kde sa študovala závislosť prúdu na rýchlosti skenu, ďalej metódy diferenčne pulzná voltametria (DPV) a square wave voltametria (SWV). Pracovalo sa s objemom 10 ml roztoku, ktorý obsahoval – 0,1 mmol/l analytu a elektrolyt o pH 7,3. Meralo sa v rôznych hodnotách pH od 1,2 – 12,2. Kalibračná krivka pre SWV bola vytvorená vynesím závislosti prúdu na koncentrácii MDMA (8,7; 17,4; 26,1; 34,7; 43,4  $\mu\text{M}$ ). Pre MA je pozorovaná jedna vlna nad pH 9 pri potenciáli 0,92 V prislúchajúca oxidácii sekundárneho amínu prítomného v molekule. U CV pre MDA je pozorovaný tiež jeden anodický pík pri potenciáli 1,17 V pri pH 2. DPV u MDMA ukázala anodický pík pri  $E = 1,18$  V. Druhý pík sa objavuje pri  $E = 1,31$  pri pH 4, nad pH 9 je ďalší pík pri  $E = 0,86$  V.



**Obr. 6:** Štruktúry látok amfetamínu a metamfetamínu

Pre štúdium analyzovaných látok bola použitá i HPLC/DAD vybavená komerčnou kolonou Tracer Excel 120 ODS-B (250 mm x 4 mm, 5  $\mu$ m) a UV detekciou s maximálnou vlnovou dĺžkou 210 nm. Mobilná fáza pozostávala z metanolu a 50 mmol/l octanu amónneho (pomer 40:60) obsahujúceho 0,1% trietylamínu, výsledné pH bolo 3,9, prietoková rýchlosť 0,8 ml/min. [29]

#### 2.4.5 Detekcia MDMA pomocou chemicky modifikovanej elektródy

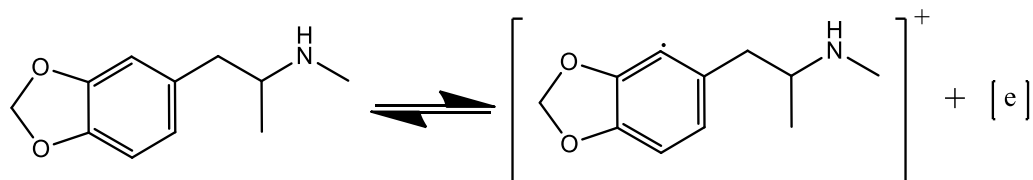
Štúdium MDMA ako zložky extázy využívalo elektródy modifikovanej pomocou cucurbit[n]urilu (Obr. 7). Cucurbituril (skr. CB<sub>n</sub>) patrí medzi makrocyclické molekuly vyrobené z n – jednotiek glykolurilu spojených metylénovými mostíkmi. Sú to symetrické chemické látky a obsahujú hydrofóbnu dutinu tvorenú karbonylovými skupinami orientovanými von, čím je táto molekula bohatá na elektróny. Ďalšími vlastnosťami je tepelná stabilita, chemická intertnosť a rozpustnosť vo vode. [30-31]



**Obr. 7:** Štruktúra cucurbiturilu CB<sub>6</sub>. [32]

K voltametrickej analýze bol použitý Autolab III s potenciostatom. Pracovalo sa v trojelektrodovom zapojení – elektróda zo skelného uhlíku ako merná elektróda, platinový drôtik ako pomocná a Ag/AgCl naplnená KCl ako referenčná. Vyleštená merná elektróda bola vložená do ultrazvuku v destilovanej vode približne na 5 minút. Následne bola

prevedená modifikácia mernej i platinovej elektródy 2 spôsobmi – na povrch bol nanášaný roztok (2,5  $\mu$ l) Nafion – metanolu s  $CB_6$ . Druhým spôsobom modifikácie elektródy bolo použitie rotačného zariadenia na otáčanie elektródy pri 220 otáčok/min. Pre porovnanie bola použitá merná i platinová elektróda bez modifikácie. Roztok Nafion/methanolu/ $CB_6$  bol pripravený: 2,6  $\mu$ l roztoku Nafionu bolo vložené do 1 ml vialky. Roztok  $CB_6$  o koncentrácii  $7,9 \cdot 10^{-6}$  mol/l s 0,2 M NaCl o objeme 4,4  $\mu$ l bol pridaný do roztoku Nafionu. Objem do 1 ml bol doplnený metanolom. Do elektrochemickej cely bol pridaný roztok KCl a kyslík bol odstránený prebubláním dusíkom 8 minút. Štandardný roztok obsahujúci 1 mg MDMA v 1 ml metanolu, bol zriedený deionizovanou vodou (v pomere 1:24) na výslednú koncentráciu  $2,07 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Použitou metódou bola metóda štandardného prídavku MDMA. Rýchlosť skenu bola pri 25, 50, 60, 80, 100, 150 mV/s. Odozvu pre MDMA poskytovala len modifikovaná uhlíková elektróda. Prvý anodický pík bol pri potenciáli 1,1 V. Pík pochádza z oxidácie MDMA aromatického jadra a vytvorí sa kation radikál (Schéma 2), ktorý pravdepodobne dimeruje a generuje sa druhý pík pri špecifických podmienkach. [31] Použitie rotačného zariadenia pre modifikáciu poskytuje citlivejšie stanovenie - medza detekcie (LOD = 2,7 mol/l) a medza stanovenia (LOQ = 9,1 mol/l). [33]



**Schéma 2:** Mechanizmus oxidácie MDMA, pri ktorom dochádza k tvorbe kation radikálu [28]

### 3. Biologicky aktívne látky

V prírode sa vyskytuje veľké množstvo biologicky aktívnych látok najmä v rastlinách, ktoré môžu byť využité na liečbu rôznych typov ochorení. Použitie našli pri infekčných chorobách, rakovine a využívajú sa proti parazitom a mikroorganizmom. Patria medzi účinné antioxidanty, analgetiká a podporujú rýchlejšie hojenie rán. Doposiaľ bolo charakterizovaných mnoho rastlín a ich metabolitov, ktoré sa využívajú ako alternatíva ku komerčným liečivám s minimálnymi nežiadúcimi účinkami.[34] Okrem liečiv tieto

látky sú prítomné v pesticídoch, kde majú vplyv na respiračný, nervový či hormonálny systém. Ďalej našli využitie aj v parfumérii či kozmetike. [35]

Staroveké kultúry po celom svete využívali rastlinné materiály a rastlinné výťažky proti mnohým chorobám postihujúcich ľudskú populáciu a ich tradičné liečebné postupy boli časom zaužívané.[36] V súčasnosti je populárna oblasť tradičnej medicíny a látok využívaných u domorodých liečiteľov. [34]

Morfín izolovaný z ópiového mlieka bol pôvodne prvým farmaceutickým prírodným produktom. Následne sa spustila vlna objavov ďalších liečiv, ako napr. atropínu, kofeínu a mnoho ďalších. Nové rastlinné alkaloidy spustili skúmanie prírodných látok, vďaka ktorým dochádza k produkcii farmaceutík prírodného pôvodu. Touto štúdiou prírodných látok sa vynašlo prvé lokálne anestetikum s účinnou zložkou kokaínu. Ďalším významným krokom bolo porozumenie organickým syntézam a chemickým štruktúram, vďaka ktorým vznikli komerčne dostupné prvé deriváty prírodných produktov ako napr. kyselina acetylsalicylová a diacetylmorfín. [34,37]

### 3.1 Alkaloidy

Alkaloidy sú chemické zlúčeniny, ktoré obsahujú aspoň jeden atóm dusíka zo skupiny amínu. Aminoskupiny v alkaloidoch funguje ako báza a pri reakcii s kyselinou dáva soľ. Tieto látky majú rôzne fyziologické účinky na ľudí a zvieratá a vyskytujú sa predovšetkým v rastlinách v bunkovej štrave obvodových pletív. Sú to látky so silným účinkom, ale vo väčších dávkach sú jedovaté. Medzi známe alkaloidy patria morfín, chinín, efedrín, nikotín a mnoho ďalších. Všeobecne platí, že daný druh obsahuje niekoľko druhov alkaloidov ako napr. čeľaď makovitých rastlín obsahuje asi 30 rôznych druhov. Niekoľko alkaloidov bolo zistených u húb i u živočíšnych druhov ako je severoamerický bobor (*Castor Canadensis*) a u jedovatých žiab (*Phyllobates*).

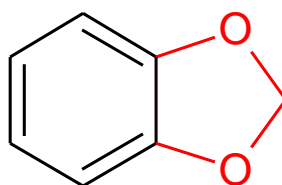
Funkcia alkaloidov v rastlinách ešte nie je úplne objasnená. Je navrhnuté, že alkaloidy sú odpadové produkty metabolizmu rastlín, ale môžu slúžiť špecifickým biologickým procesom. Napr. v niektorých rastlinách sa koncentrácia alkaloidov zvyšuje tesne pred tvorbou semien a keď je semeno zrelé, tak koncentrácia klesá. Taktiež môžu alkaloidy chrániť niektoré rastliny pred určitým druhom hmyzu.

Liečivé vlastnosti alkaloidov sú rozmanité. Zatiaľ čo morfín má silné omamné účinky, kodeín je často používaným analgetikom. Existujú aj alkaloidy, ktoré ovplyvňujú dýchanie

a môže dochádzať až k respiračnej depresii (nedostatok dychu). Mnoho alkaloidov má klinické využitie ako je napr. alkaloid tubocurarín, ktorý je aktívnou zložkou šípového jedu curare a používa sa na uvoľnenie svalov. Ďalšími alkaloidmi, použitými pri liečbe mnohých typov rakoviny, je vinkristín a vinblastín, ktoré zabraňujú rastu rakovinových buniek. Nikotín získaný z listov tabaku je hlavný alkaloid a hlavnou návykovou zložkou tabaku. Niektoré alkaloidy sú nezákonné drogy a jedy ako meskalín – halucinogénny liek. [38] Alkaloidy môžu mať rôznu štruktúru – môžu obsahovať indolový, pyridínový či benzodioxolový kruh. [39]

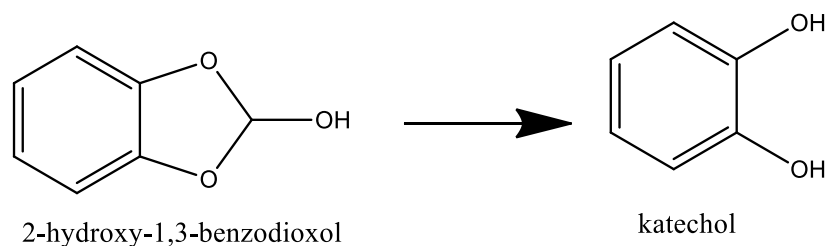
### 3.2 Benzodioxol

1,3-benzodioxol, iným názvom i 1,2-metyléndioxybenzen, patrí medzi organické zlúčeniny. Radí sa do skupiny derivátov benzénu a heterocyklických zlúčenín.[40] Benzodioxol pozostáva z benzénového kruhu substituovaného metyléndioxy funkčnou skupinou (Obr. 8). Hoci táto látka nie je moc dôležitá, existuje mnoho zlúčenín obsahujúcich metyléndioxyfenylovú skupinu, ktorá sa nachádza v mnohých farmaceutických výrobkoch a dokonca poskytuje štruktúru aj mnohým drogám.[41] Mnoho derivátov je prítomných v prírodných látkach, ktoré vykazujú biologickú aktivitu a poskytujú antimikrobiálne, protirakovinové, protizápalové, antidepressívne, antikonvulzívne a antioxidantné účinky.[42] Vyskytuje sa v rôznych prírodných látkach napr. sesamol, piperonal, safrol, atď. [43]



**Obr. 8:** štruktúrny vzorec 1,3-benzodioxolu (funkčná metyléndioxylová skupina je zvýraznená červenou farbou)

Metabolizmus 1,3-benzodioxolu je iniciovaný mikrozómovou hydroxyláciou metylénovej skupiny päťčlenného cyklu. Výsledný medziprodukt 2-hydroxy-1,3-benzodioxol je nestabilný a vo vodnom roztoku hydrolyzuje na katechol (Schéma 3). Uhlíkový atóm metylénovej skupiny sa uvoľňuje vo forme formiátu in vitro, oxid uhličitý v štúdiu in vivo. [44]



**Schéma 3:** Schéma metabolizmu 1,3-benzodioxolu

Hoci štruktúra benzodioxolového kruhu je veľmi častá ako u biologicky aktívnych látok prírodného charakteru, tak i v umelo syntetizovaných liečivách a drogách, jeho elektrochemické vlastnosti neboli doposiaľ systematicky skúmané a popísané v odbornej literatúre. Preto je jedným z cieľov praktickej časti tejto diplomovej práce poodhaliť chovanie 1,3-benzodioxolu a jeho derivátov v elektrochemickom článku za oxidačných podmienok.

## 4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Chemikálie

- 1,3-benzodioxol (Sigma – Aldrich, St. Louis)
- N-(1,3-benzodioxol-5-yl-metyl)-N-metylamín (Maybridge, Spojené kráľovstvo)
- JTE 907 (Sigma – Aldrich, čistota  $\geq 98\%$ )
- Kyselina octová (Lach – Ner, Česká republika)
- Kyselina fosforečná (Sigma – Aldrich, St. Louis)
- Kyselina boritá (Lachema Brno, Česká republika)
- Hydroxid sodný (p.a., Chemapol, Praha)
- Etanol (HPLC grade, VWR International USA)
- Octan amónny (Lachema Brno, Česká republika)
- N-acetylcystein (Sigma – Aldrich, St. Louis)
- Alumina oxid (Sigma – Aldrich, St. Louis)
- Acetonitril (HPLC grade, VWR International, USA)

### 4.2 Prístrojové vybavenie

Na úpravu pH Britton – Robinsonovho pufru bol použitý pH meter InoLab pH 720 s kombinovanou sklenenou elektródou SenTix 41 (WTW, Nemecko). K meraniu voltametrických kriviek a následnému vyhodnocovaniu použitých metód cyklickej a diferečne pulznej voltametrie sa používal prístroj Eco – Tribo polarograf (Polaro – Sensors, Praha) riadený programom Polar 4.

Ďalšou použitou metódou bolo spojenie elektrochemickej cely a hmotnostného spektrometru s iónovou pascou Agilent 1100 Series LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) a s ionizáciou elektrosprejom (ESI). Použitá elektrochemická cela (Model 5021A, ESA, Chelmsford USA) s uhlíkovou poréznu pracovnou elektródou a hydrogenpalladiovou referenčnou elektródou (Pd/H<sub>2</sub>) bola pripojená k potenciostatu ADLC1 (Lab. prístroje, Praha).

Elektrolýza roztoku bola prevedená na prístroji Autolab so softvérom NOVA 1.10 (metrohm Autolab B.V., Holandsko).



## 4.3 Pracovné postupy

### 4.3.1 Príprava elektródy pred meraním

Povrch mernej elektródy zo skelného uhlíka musel byť obnovovaný pomocou vodnej suspenzie – aluminy oxidu ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) nanesej na leštiacej tkanine. Následne bola elektróda ponechaná 1 minútu v ultrazvukovom kúpeli v skúmavke s destilovanou vodou a nakoniec opláchnutá destilovanou vodou.

### 4.3.2 Príprava zásobných roztokov

Zásobné roztoky 1,3-benzodioxolu, 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetanamínu o koncentrácii  $10^{-3}$  mol/l boli pripravené vo vode, zatiaľ čo JTE 907 bolo rozpustené v etanole.. Podľa návažky daných látok boli vypočítané presné koncentrácie.

### 4.3.3 Cyklická voltametria – závislosť na rýchlosti skenu

Meranie bolo prevedené v trojelektrodovom zapojení – merná elektróda bola zo skelného uhlíka, argentchloridová elektróda bola použitá ako referenčná a platínová ako pomocná elektróda. Pomocou cyklickej voltametrie bola zmeraná závislosť prúdu na rýchlosti polarizácie elektródy. Celkový objem vo voltametrickej cele bol 10 ml – 5 ml Britton – Robinsovho pufru, 4 ml redestilovanej vody a 1 ml vzorky o koncentrácii  $10^{-3}$  mol/l. Pre meranie bol použitý Britton – Robinsonov pufr o pH 3; 7 a 10. Rozsah merania bol od 500 mV po 20 mV (vid'. tabuľka 1). Pre každú rýchlosť skenu bola zmeraná krivka pre základný elektrolyt (5 ml pufru a 4 ml redestilovanej vody) a k tomu odpovedajúca krivka analytu v dvoch cykloch.

U látky JTE 907 bola do voltametrickej nádoby umiestnená nádobka s vycorovou fritou, aby bolo možné merať v malom objeme. Do voltametrickej nádoby bol vložený tlmivý roztok a celkový objem vo nádobke s vycorovou fritou činil 500  $\mu\text{l}$  – 250  $\mu\text{l}$  pufru, 200  $\mu\text{l}$  redestilovanej vody a 50  $\mu\text{l}$  vzorky. Opäť bola zmeraná krivka pre základný elektrolyt a v dvoch cykloch krivka pre analyt. Parametre metódy sú zhrnuté v tabuľke 2.

**Tabuľka 1:** Rozsah rýchlosti polarizácie mernej elektródy

| <b>Hodnoty polarizačnej rýchlosti v<br/>[mV/s]</b> |     |
|--|-----|
| 500  | 100 |
| 400  | 75  |
| 300  | 50  |
| 200  | 20  |

**Tabuľka 2:** Parametre metódy

|                      |          |
|----------------------|----------|
| Počiatočný potenciál | 0 mV     |
| Konečný potenciál    | 1500 mV  |
| Rýchlosť skenu       | 100 mV/s |
| Počet skenov         | 2        |
| Doba čistenia        | 1 s      |

#### 4.3.4 Cyklická voltametria/ diferenčne pulzná voltametria – závislosť na pH

Metódou cyklickej voltametrie (CV) a diferenčne pulznej voltametrie (DPV) bola zmeraná závislosť prúdu a potenciálu na pH. Koncentrácia zásobných roztokov bola  $10^{-3}$  mol/l. Celkový objem v nádobke činil 10 ml – 5 ml pufru, 4 ml redestilovanej vody a 1 ml vzorky (1,3-benzodioxolu a 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmelanamínu). Pred každým meraním bol pripravený roztok Britton-Robinsonov pufru o príslušnom pH. Jednotlivé hodnoty pH použitého pufru sú zhrnuté v tabuľke 3. Pre každú hodnotu pH bol opäť zaznamenaný voltamogram základného elektrolytu (5 ml tlmivého roztoku, 4 ml vody) a k tomu prislúchajúca krivka analytu. U cyklickej voltametrie bol analyt premeraný v dvoch cykloch, u diferenčne pulznej voltametrie počet skenov bol dva, ale po každom skene musela byť merná elektróda vyleštená. Parametre metódy sú zhrnuté v tabuľke 4 pre cyklickú voltametriu a v tabuľke 5 pre diferenčne pulznú voltametriu.

U látky JTE 907 bola použitá len diferenčne pulzná voltametria na sledovanie závislosti na pH. Hodnoty pH u tejto látky boli 3; 4; 5; 6; 7 a 10. Meranie bolo prevedené v nádobke s vycorovou fritou s objemom 500  $\mu$ l – 250  $\mu$ l pufru, 200  $\mu$ l redestilovanej vody

a 50  $\mu$ l vzorky. Pre každú hodnotu pH bol zmeraný základný elektrolyt (250  $\mu$ l pufru, 200  $\mu$ l redestilovanej vody) a v dvoch opakovaníach bola zmeraná aj použitá látka.

**Tabuľka 3:** Hodnoty pH Britton – Robinsonovho pufru

| Hodnoty pH |     |      |
|------------|-----|------|
| 2          | 5,5 | 9    |
| 2,5        | 6   | 9,5  |
| 3          | 6,5 | 10   |
| 3,5        | 7   | 10,5 |
| 4          | 7,5 | 11   |
| 4,5        | 8   | 11,5 |
| 5          | 8,5 | 12   |

**Tabuľka 4:** Parametre metódy pre meranie závislosti prúdu na pH – CV

|                      |          |
|----------------------|----------|
| Počiatkový potenciál | 0 mV     |
| Konečný potenciál    | 1600 mV  |
| Rýchlosť skenu       | 100 mV/s |
| Počet skenov         | 2        |
| Doba čistenia        | 1 s      |

**Tabuľka 5:** Parametre metódy pre meranie závislosti prúdu na pH – DPV

|                      |         |
|----------------------|---------|
| Počiatkový potenciál | 0 mV    |
| Konečný potenciál    | 1500 mV |
| Rýchlosť skenu       | 20 mV/s |
| Počet skenov         | 1       |
| Pokojuvú dobu        | 5 s     |
| Výška pulzu          | 50 mV   |
| Šírka pulzu          | 80 ms   |

#### 4.3.5 Diferenčne pulzná voltametria – kalibračná závislosť

Pomocou diferenčne pulznej voltametrie bola sledovaná závislosť prúdu na koncentrácii analytu (vid'. tabuľka 6). Meranie prebiehalo v objeme 10 ml: 5 ml Britton – Robinsonovho tlmivého roztoku, 4 ml redetilovanej vody a vypočítaný objem pridávanej látky pre danú koncentráciu. Pre každú koncentráciu analytu bola krivka zmeraná dvakrát, pričom po každom meraní musel byť povrch elektródy vyleštený. Parametre metódy sú uvedené v tabuľke 7.

**Tabuľka 6:** Koncentrácie analytu pre kalibračnú závislosť

| Koncentrácia [mol/l] |                   |                   |
|----------------------|-------------------|-------------------|
| $10^{-6}$            | $8 \cdot 10^{-6}$ | $6 \cdot 10^{-5}$ |
| $2 \cdot 10^{-6}$    | $10^{-5}$         | $8 \cdot 10^{-5}$ |
| $4 \cdot 10^{-6}$    | $2 \cdot 10^{-5}$ | $10^{-4}$         |
| $6 \cdot 10^{-6}$    | $4 \cdot 10^{-5}$ |                   |

**Tabuľka 7:** Parametre metódy

|                      |         |
|----------------------|---------|
| Počiatkový potenciál | 0 mV    |
| Konečný potenciál    | 1500 mV |
| Rýchlosť skenu       | 20 mV/s |
| Počet skenov         | 1       |
| Doba čistenia        | 1 s     |
| Pokojová doba        | 10 s    |
| Výška pulzu          | 50 mV   |
| Šírka pulzu          | 80 ms   |

#### 4.3.6 Elektropolymerácia

Zásobné roztoky o koncentrácii  $10^{-3}$  mol/l boli zriedené na koncentráciu  $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Najskôr bola zmeraná krivka elektrolytu pozostávajúceho z 5 ml redetilovanej vody a 5 ml tlmivého roztoku o pH 6 u 1,3-benzodioxolu i u 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylanamínu. Následne bol pridaný vypočítaný objem skúmanej látky (1,3-benzodioxolu resp. 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylanamínu a bola zaznamenaná

krivka príslušného analytu. Bez vyleštenia elektródy bol opäť zmeraný základný elektrolyt. Parametre metódy sú uvedené v tabuľke 8.

**Tabuľka 8:** Parametre metódy

|                      |          |
|----------------------|----------|
| Počiatočný potenciál | - 400 mV |
| Konečný potenciál    | 1600 mV  |
| Rýchlosť skenu       | 100 mV/s |
| Počet cyklov         | 20       |

#### **4.3.7 Potenciostatická elektrolyza a analýza pomocou hmotnostnej spektrometrie**

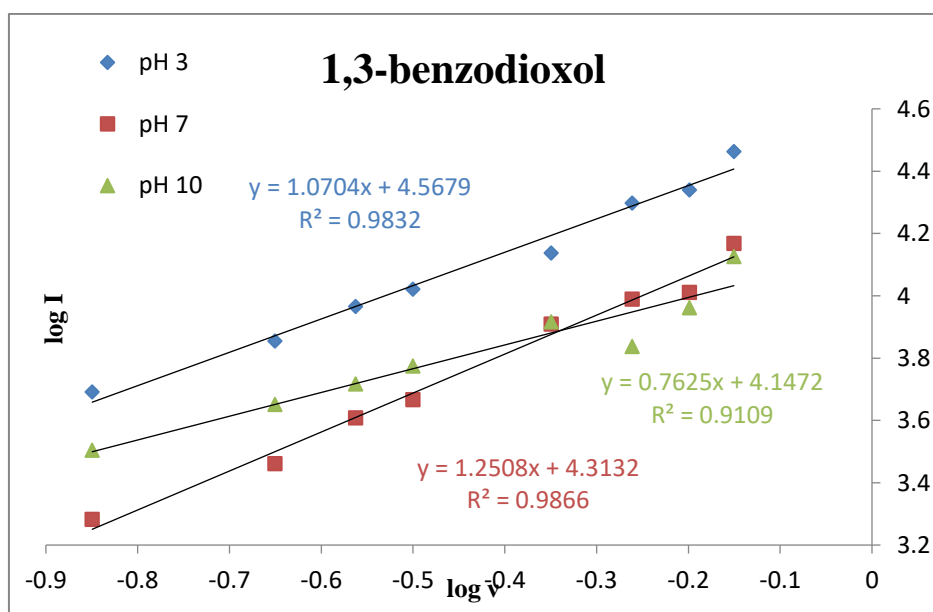
Ďalším experimentom bola analýza oxidačných produktov skúmaných látok, ktoré sa generovali oxidáciou pri konštantnom potenciáli. K analýze bola použitá metóda hmotnostnej spektrometrie s iónovou pastou ako analyzátorom a ESI ako ionizačným zdrojom. Vyhodnocovali sa spektrá oxidačných produktov a ich fragmentačné spektrá. Roztok štandardu pozostával z 200  $\mu$ l acetonitrilu, 250  $\mu$ l pufru (octan amónny a kyselina octová v koncentrácii 0,05 M), použité pH pre JTE bolo 7, u 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylanamínu a 1,3-benzodioxolu bolo pH 6) a 50  $\mu$ l roztoku analytu o koncentrácii  $10^{-3}$  mol/l). Výsledná koncentrácia analytu v elektrochemickej cele bola 0,1 mmol/l.

Elektrolyza roztokov jednotlivých látok sa vykonávala nasledujúcim postupom. Najskôr bol pripravený základný elektrolyt pozostávajúci z 2 ml pufru o pH 6 (octan amónny + kyselina octová) a 1,6 ml acetonitrilu pre roztok 1,3-benzodioxolu, JTE 907 a 1,8 ml pre roztok 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylanamínu. Takto pripravený elektrolyt bol 30 minút elektrolyzovaný, následne bola pridaná látka do celkového objemu 4 ml (výsledná koncentrácia analytov bola 0,1 mmol/l) a táto zmes bola po dobu 10 minút ďalej elektrolyzovaná. Po oxidácii bol elektrolyzát nadávkovaný do elektrochemickej cely a bol zaznamenaný diferenčne pulzný voltamogram. Súčasne boli roztoky analytu po potenciostatickej elektrolyze analyzované hmotnostnou spektrometriou. Na zistenie, či po elektrolyze vznikol ako oxidačný produkt chinón, bol použitý *N*-acetylcysteín o koncentrácii  $10^{-4}$  mol/l, ktoré boli použité pre porovnanie i do štandardu.

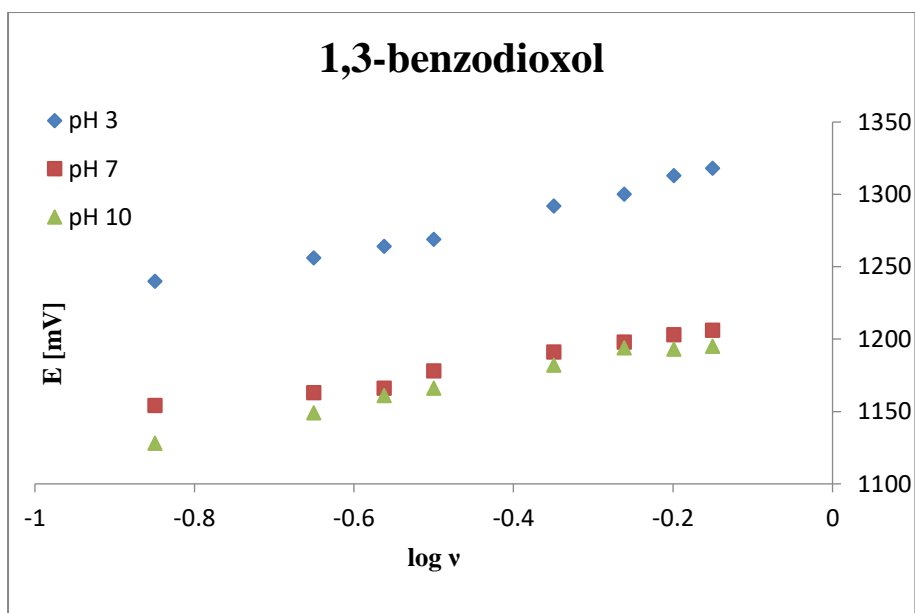
## 5. VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 5.1 Cyklická voltametria – závislosť na rýchlosti skenu

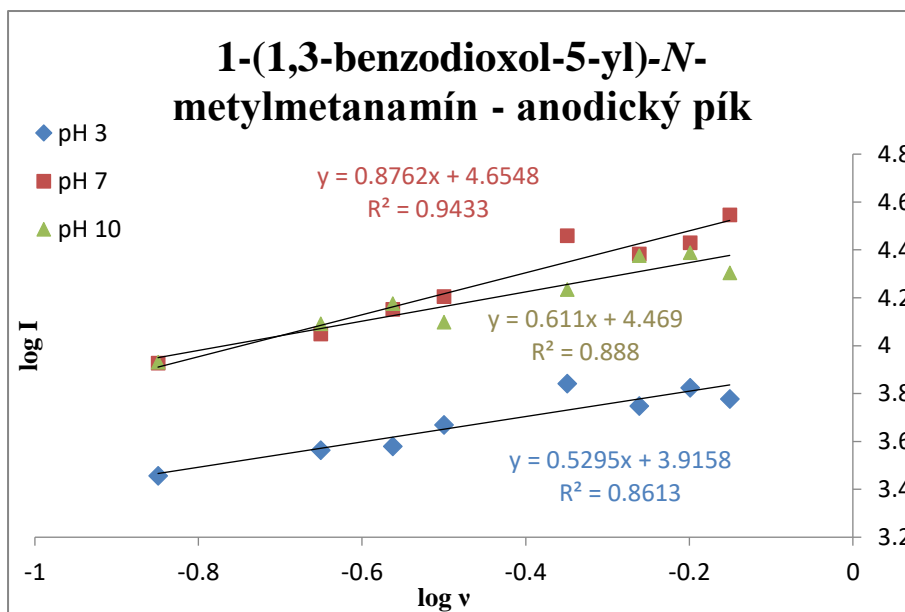
Pre 1,3-benzodioxol, 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetanamín a JTE 907 boli zaznamenané cyklické voltamogramy pri rôznych rýchlostiach polarizácie mernej elektródy v 3 rôznych prostrediach – v kyslom (pH 3), neutrálnom (pH 7) a zásaditom (pH 10) pri rozsahu merania od 500 po 20 mV/s. Vo všetkých grafoch závislosti  $\log I = f(\log v)$  (Graf č. 1, 3 a 6) je pozorovateľný lineárny trend. Smernice priamok závislostí blízke hodnote 1 značia, že prúd aj rýchlosť oxidácie u 1,3-benzodioxolu a JTE 907 je riadený adsorpciou častíc na povrch elektródy, zatiaľ čo u 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetanamínu vo všetkých troch prostrediach a u JTE 907 pri pH 3 je hodnota smernice 0,5 (čo je teoretická hodnota pre dej riadený čisto difúziou) a 1 (pre deje adsorbovateľných častíc). Oxidácia je teda riadená difúziou s iba čiastočným vplyvom adsorpciou častíc na pracovnú elektródu.[45] V grafoch závislosti  $\log I = f(\log v)$  katodického píku (Graf č. 5, 8) smernica priamok má hodnotu blízku 1, čo znamená, že katodický a jeho príslušný anodický pík odpovedá redukcii a oxidácii produktu adsorbovaného na povrch elektródy. Závislosti  $E = f(\log v)$  ukazujú posun potenciálu píku s narastajúcou rýchlosťou polarizácie, ktorý je typický pre ireverzibilné elektródové reakcie. Polynomický trend (Graf č. 2,4 a 7) závislosti dokazuje prítomnosť chemickej reakcie, ktorá nasleduje po elektródovej reakcii.



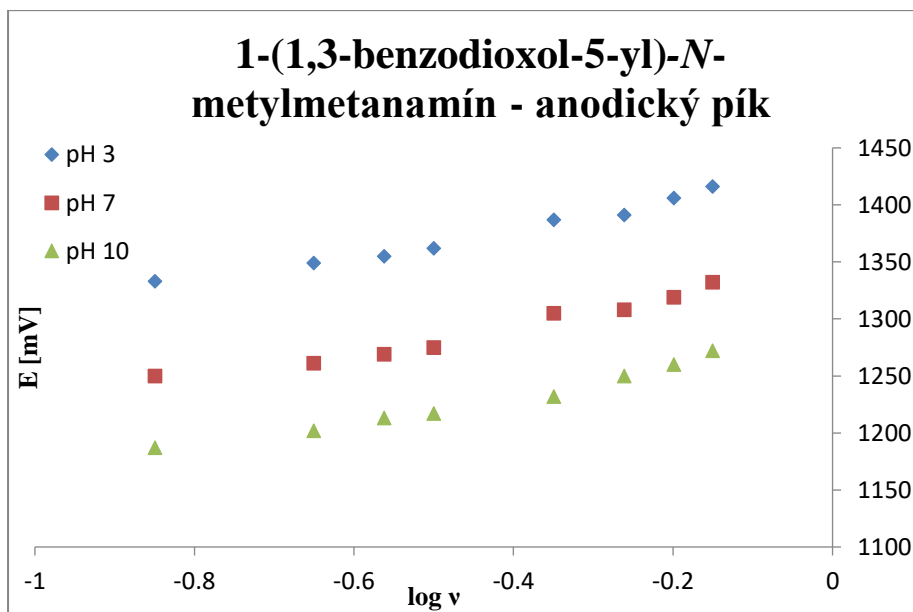
**Graf č. 1:** Závislosť logaritmu prúdu na logaritme rýchlosti polarizácie elektródy u 1,3-benzodioxolu pre pH 3, 7, 10



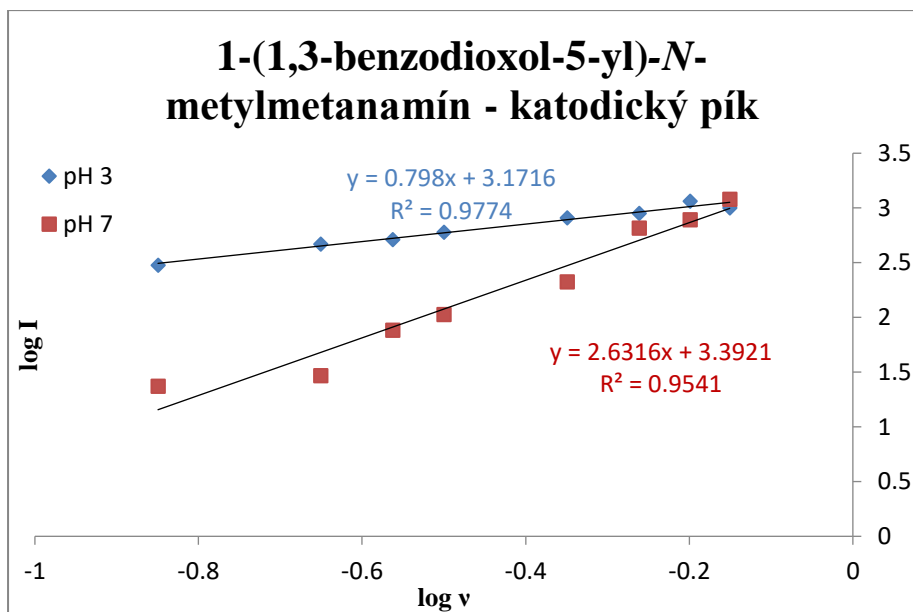
**Graf č. 2:** Závislosť potenciálu na logaritme polarizácie elektródy pre 1,3-benzodioxol pri pH 3, 7, 10



**Graf č. 3:** Závislosť logaritmu prúdu na odmocnине rýchlosti polarizácie elektródy pre 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-metylmetylamín pre anodický pík pri pH 3, 7, 10

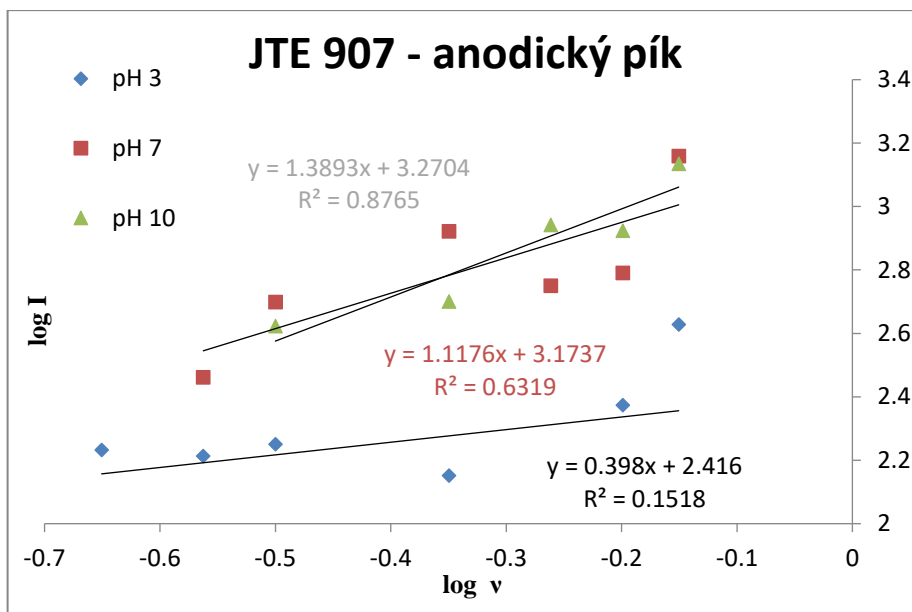


**Graf č. 4:** Závislosť potenciálu na logaritme rýchlosti polarizácie elektródy pre 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-methylmetanamínu pre hlavný anodický pík pri pH 3, 7, 10

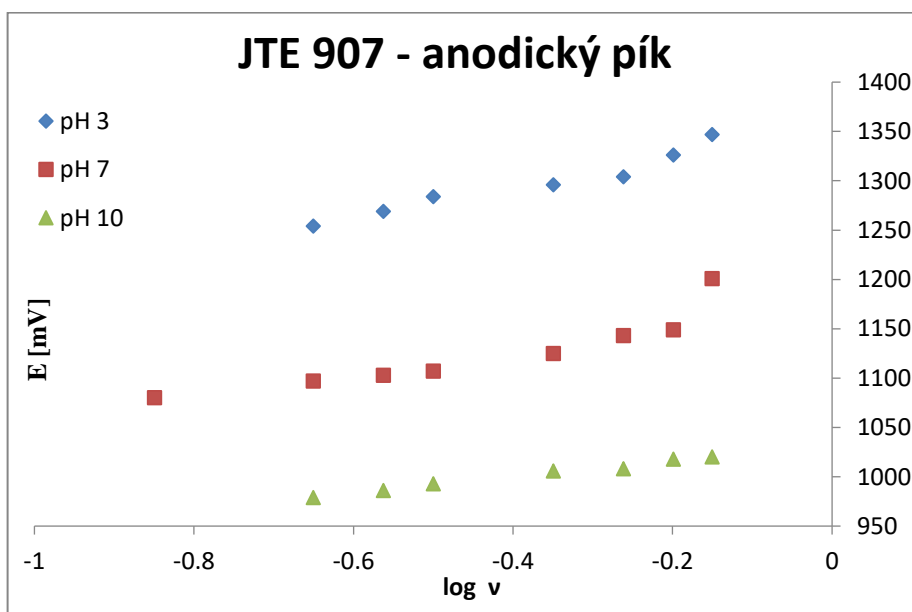


**Graf č. 5:** Závislosť logaritmu prúdu na logaritme rýchlosti polarizácie elektródy pre 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-methylmetanamínu pre katodický pík pri pH 3, 7, 10

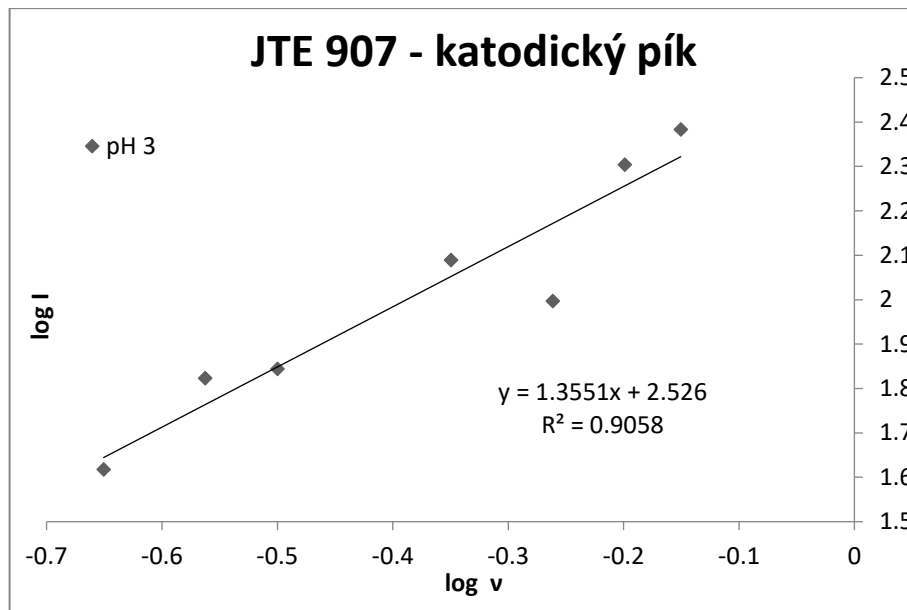




**Graf č. 6:** Závislosť logaritmu prúdu na logaritme rýchlosti polarizácie elektródy pre JTE 907 pre anodický pík pri pH 3, 7 a 10



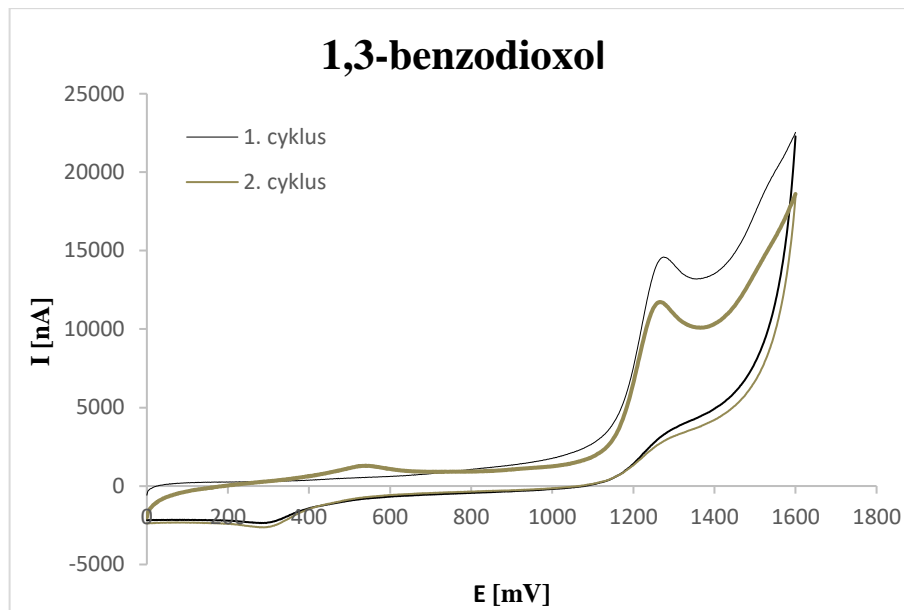
**Graf č. 7:** Závislosť potenciálu na logaritme rýchlosti polarizácie elektródy u JTE 907 pre anodický pík pri pH 3, 7, 10



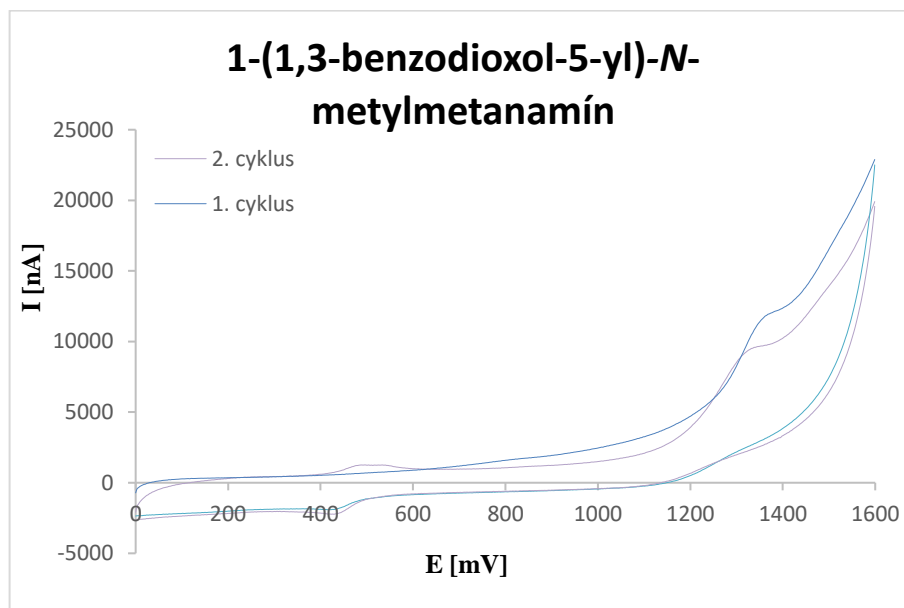
**Graf č. 8:** Závislosť logaritmu prúdu na logaritme rýchlosti polarizácie elektródy u JTE 907 pre katodický pík v kyslom prostredí

## 5.2 Cyklická voltametria/ diferenčne pulzná voltametria – závislosť na pH

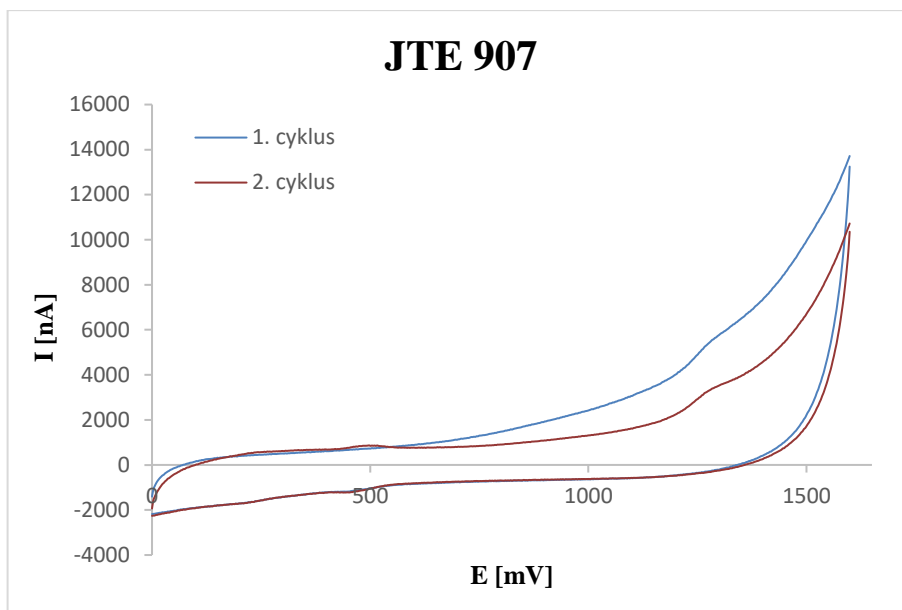
Na voltamograme 1,3-benzodioxolu (Obr. 9), 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylanínu (Obr. 10) a JTE 907 (Obr. 11) je vidieť hlavný anodický pík, ktorý odpovedá oxidácii látok a nachádza sa pri potenciáli približne 1100 – 1200 mV. V obrátenom smere polarizácie sa objavuje katodický pík pri nižších potenciáloch (300 - 500 mV) zaznamenaný najmä v kyslom prostredí. Jemu prislúcha nový anodický pík v druhom cykle. Tieto dva píky odpovedajú redukcii a spätnej oxidácii oxidačného produktu vstupnej látky. K anodickému píku odpovedajúcemu oxidácii látky sa v opačnom smere polarizácie neobjavujú katodické píky, čo poukazuje na ireverzibilnú oxidáciu 1,3-benzodioxolu a jeho derivátov.



**Obr. 9:** Cyklický voltamogram 1,3-benzodioxolu ( $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ ) v Britton-Robinsonovom pufrí pH 3. Prvé dva cykly, rýchlosť polarizácie 100 mV/s.



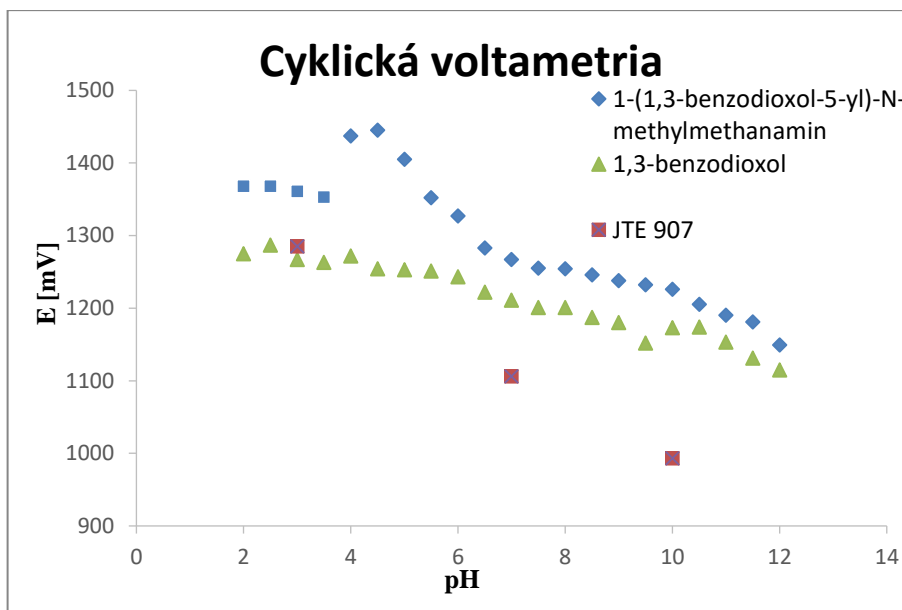
**Obr. 10:** Cyklický voltamogram 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamín ( $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ ) v Britton-Robinsonovom pufrí pH 3. Prvé dva cykly, rýchlosť polarizácie 100 mV/s.



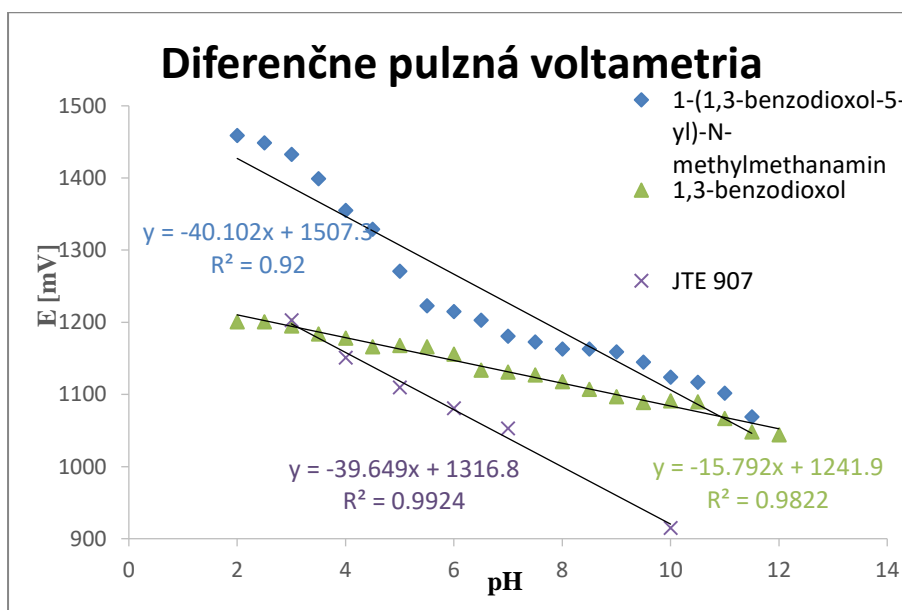
**Obr. 11:** Cyklický voltamogram JTE 907 ( $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ ) v Britton-Robinsonovom puffri pH 3. Prvé dva cykly, rýchlosť polarizácie  $100 \text{ mV/s}$ .

Z grafov závislosti potenciálu na pH pre 1,3-benzodioxolu, 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamín a JTE 907 u cyklickej (Graf č. 9) i diferenčne pulznej voltametrie (Graf č. 10) je vidieť, že krivka má lineárny charakter. Ďalej zo všetkých grafov vyplýva, že potenciál so zvyšujúcim sa pH klesá. Nenulové smernice kriviek poukazujú, že behom oxidácie dochádza k odštiepeniu protónov za súčasného odštiepenia elektrónov. V grafe závislosti potenciálu na pH zmeraného pomocou cyklickej voltametrie pre látku 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamín (Graf č. 9) vidieť nárast potenciálu, ktorý môže súvisieť s oxidáciou ďalšieho redoxného centra v molekule, keďže benzodioxolovej skupiny sa môže oxidovať aj amínová skupina pri vyššom potenciáli. Prítomnosť dvoch reakčných centier v molekule je viditeľná aj na diferenčne pulzných voltamogramoch, kde sa závislosti od pH objavujú dva anodické píky.

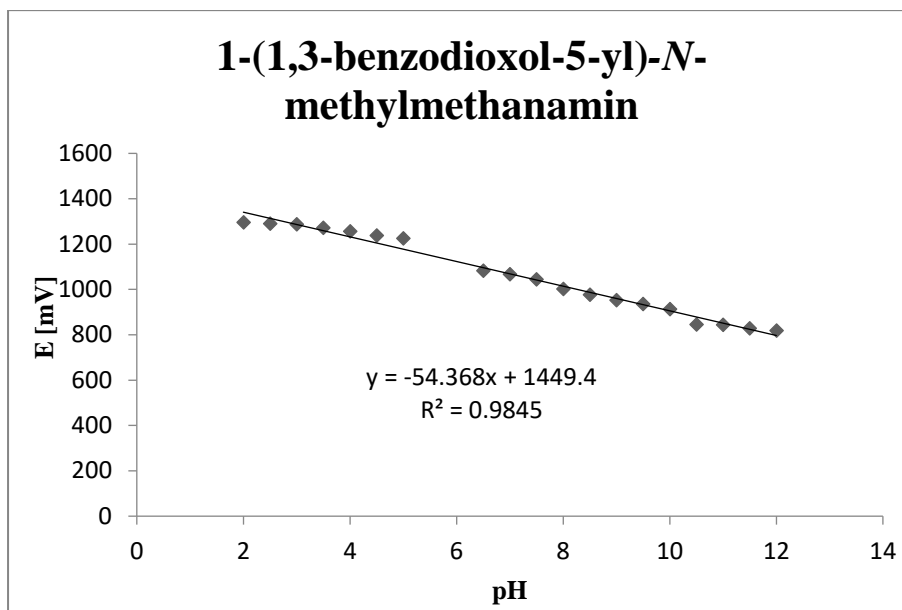
V grafoch závislosti prúdu na rôznej hodnote pH pre 1,3-benzodioxol (Graf č.12, 13), 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamín (Graf č. 14, 15) a JTE 907 (Graf č. 17, 18) u cyklickej i diferenčne pulznej voltametrie sú najvyššie prúdy u iných hodnôt pH. Hodnota najvyššieho prúdu pre 1,3-benzodioxol je u pH 6 a 10, pre 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamín je v rozmedzí pH 6 – 8 a najvyšší prúd pre JTE 907 je u pH 7.



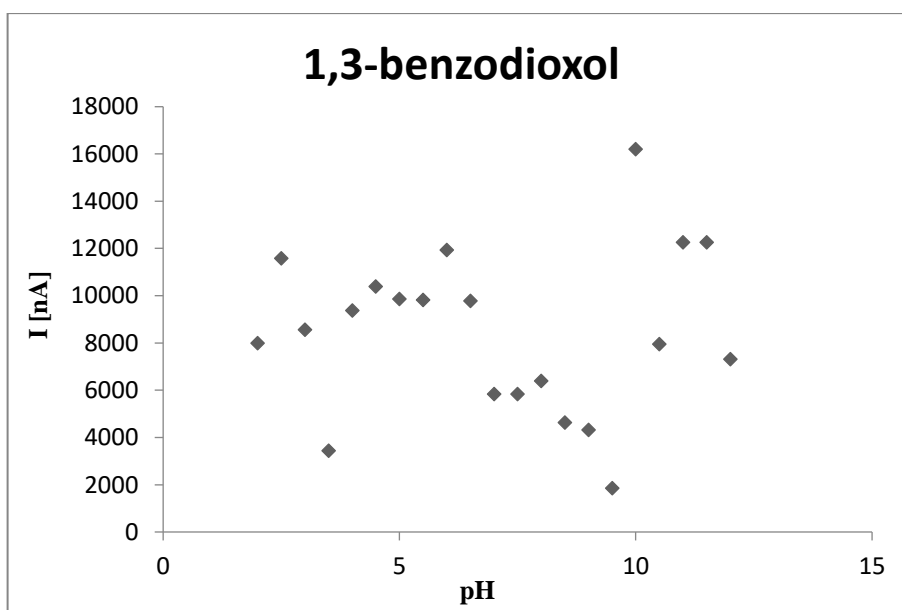
**Graf č. 9:** Závislosť potenciálu na rôznych hodnotách pH – cyklická voltametria



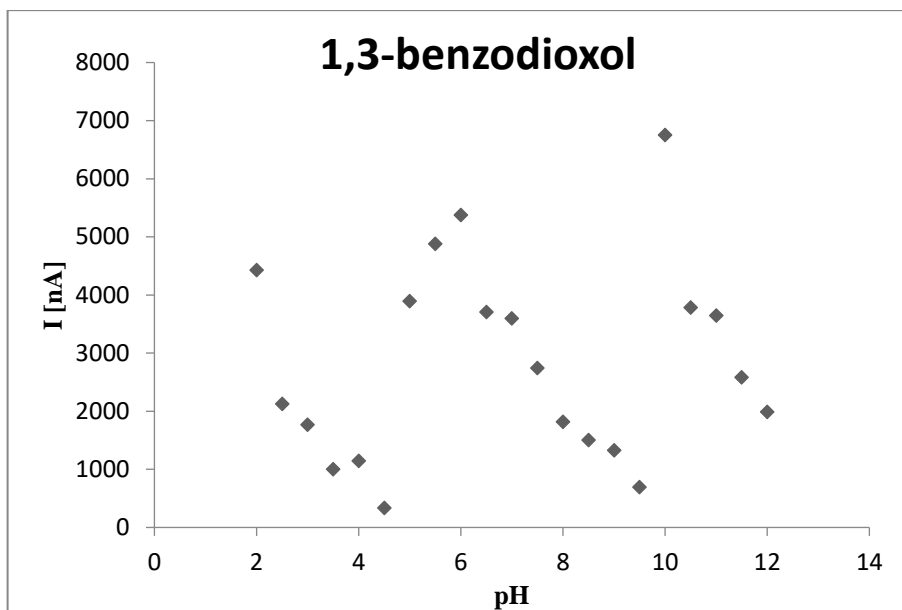
**Graf č. 10:** Závislosť potenciálu na rôznych hodnotách pH – diferenčne pulzná voltametria



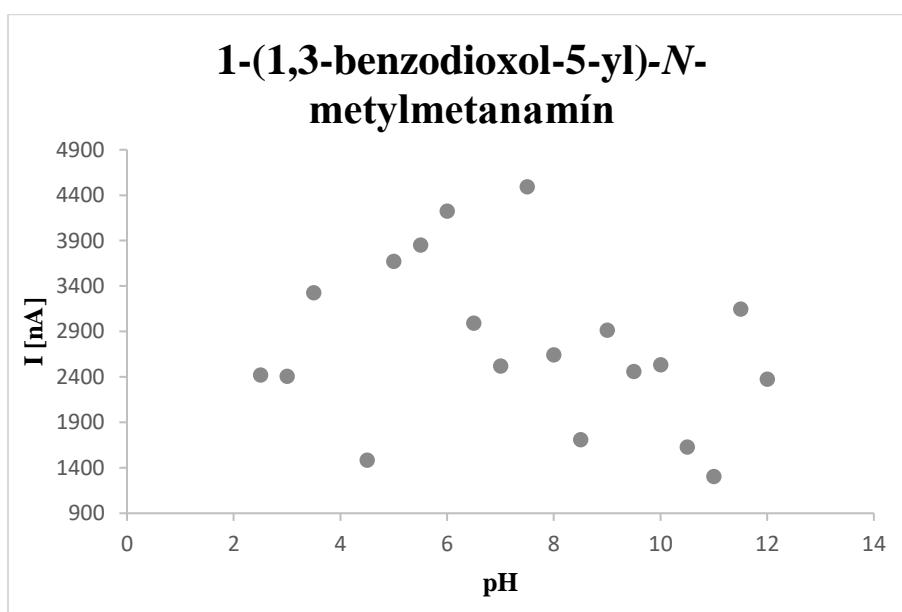
**Graf č. 11:** Závislosť potenciálu na rôznej hodnote pH – diferečne pulzná voltametria pre 1. anodický pík



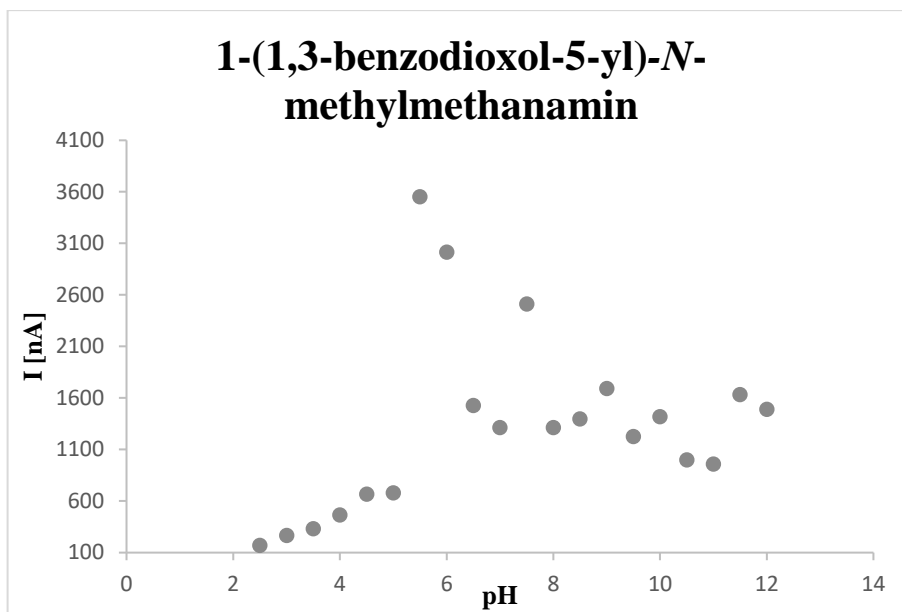
**Graf č. 12:** Závislosť prúdu na rôznych hodnotách pH – cyklická voltametria



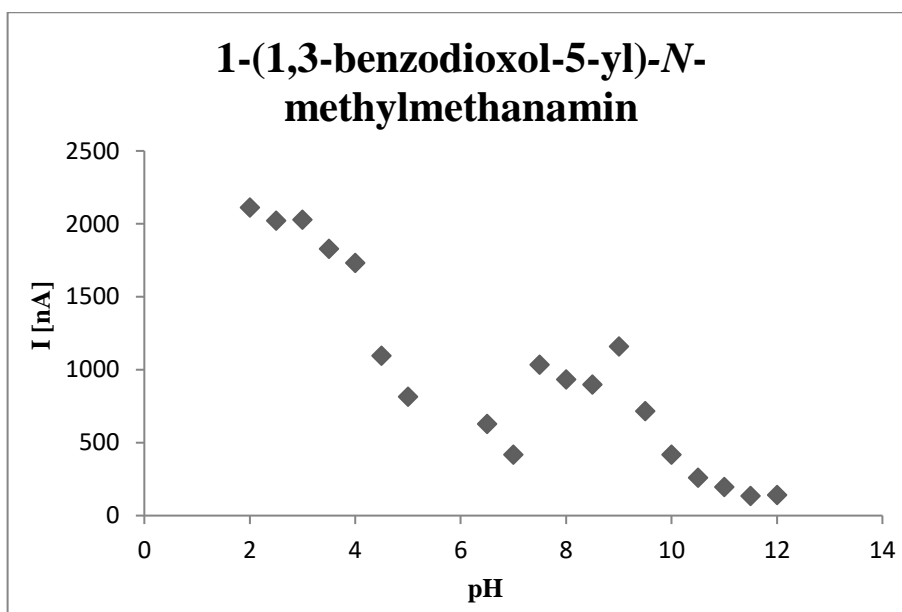
**Graf č. 13:** Závislosť prúdu na rôznych hodnotách pH – diferečne pulzná voltametria



**Graf č. 14:** Závislosť prúdu na rôznych hodnotách pH – cyklická voltametria



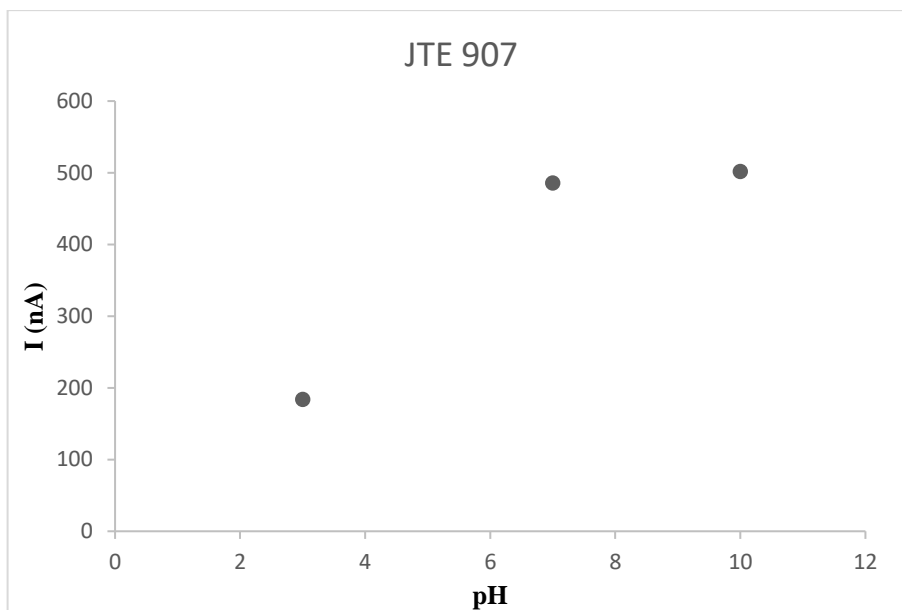
**Graf č. 15:** Závislosť prúdu na rôznych hodnotách pH – diferečne pulzná voltametria



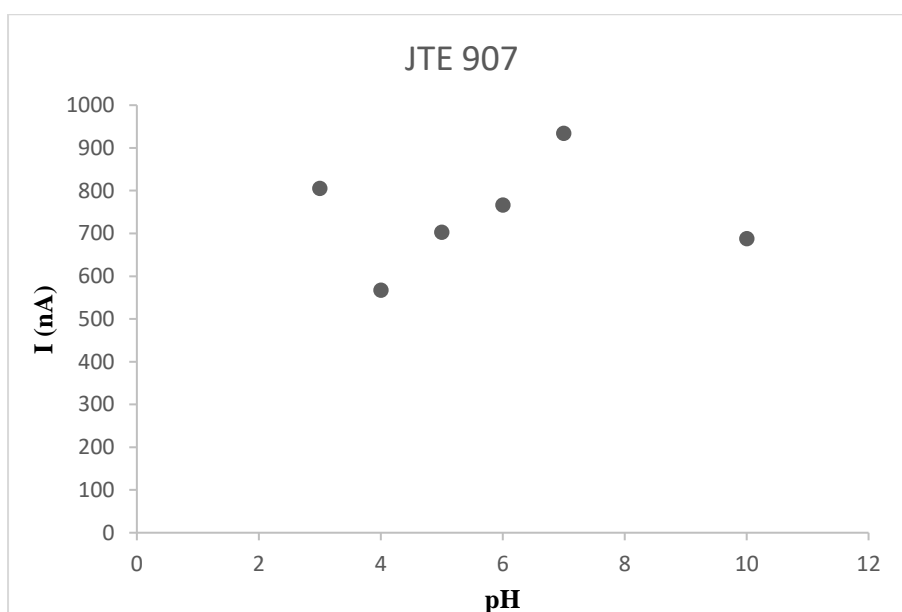
**Graf č. 16:** Závislosť prúdu na rôznej hodnote pH – diferenčne pulzná voltametria

pre 1. anodický pík





**Graf č. 17:** Závislosť prúdu na pH – cyklická voltametria

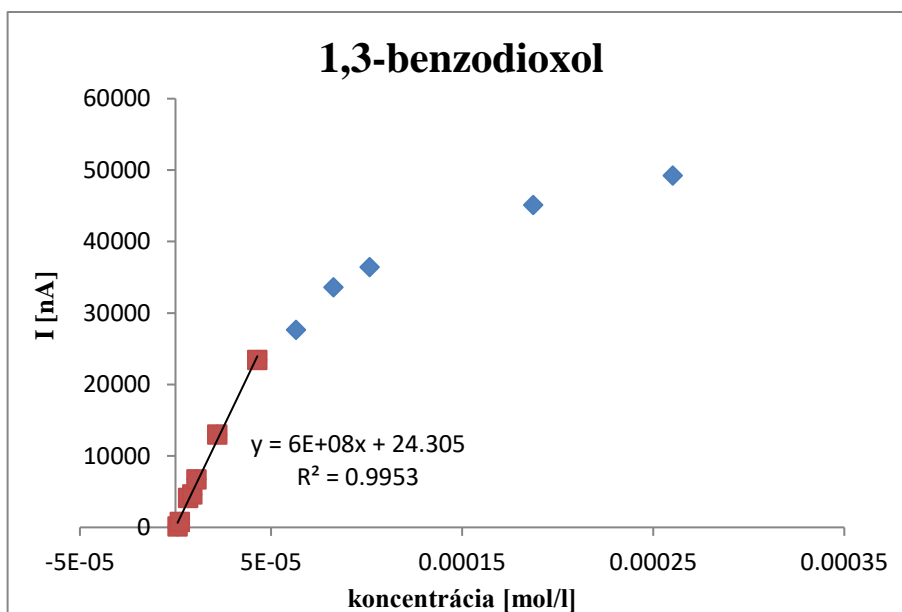


**Graf č. 18:** Závislosť prúdu na rôznej hodnote pH – diferečne pulzná voltametria

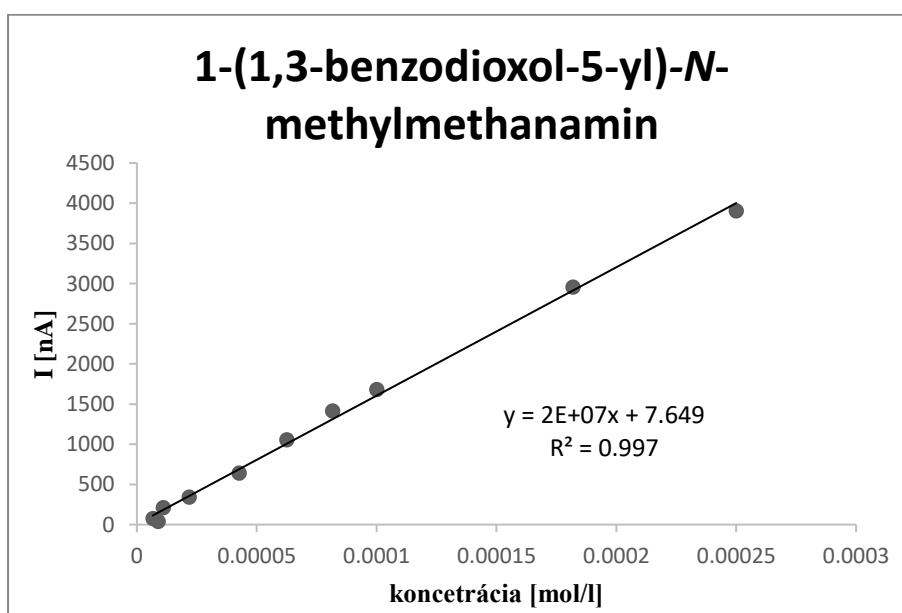
### 5.3 Diferenčne pulzná voltametria – kalibračná závislosť

V grafoch u všetkých analyzovaných látok je lineárna závislosť prúdu na meranej koncentrácii. Avšak u 1,3-benzodioxolu (graf č. 19) je mierne zakrivenie kalibračnej priamky. Tento nelineárny trend (hyperbolické zakrivenie) poukazuje na to, že po dosiahnutí určitej koncentrácie dochádza k vysýteniu povrchu elektródy. Z parametrov

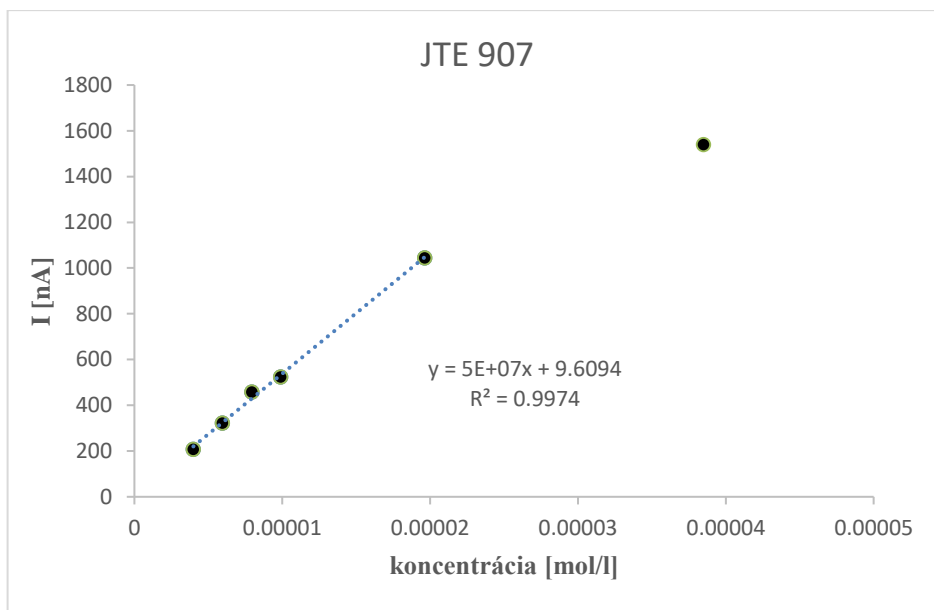
regresnej priamky bol vypočítaný limit detekcie ( $L_d$ ) podľa vzťahu  $L_d = \frac{3s_b}{a}$ , kde  $s_b$  je smerodajná odchýlka úseku regresnej priamky  $I = ac + b$ ,  $I$  predstavuje prúd,  $c$  koncentráciu látky,  $a$  je smernica priamky a  $b$  je úsek priamky. Limit detekcie (LOD) pre 1,3-benzodioxol bol stanovený na  $1,766 \cdot 10^{-6}$  mol/l, pre 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmethanamin je hodnota  $6,302 \cdot 10^{-6}$  mol/l, pre JTE 907 bol stanovený LOD na hodnotu  $4,857 \cdot 10^{-6}$  mol/l.



**Graf č. 19:** Závislosť prúdu na koncentrácii 1,3-benzodioxolu



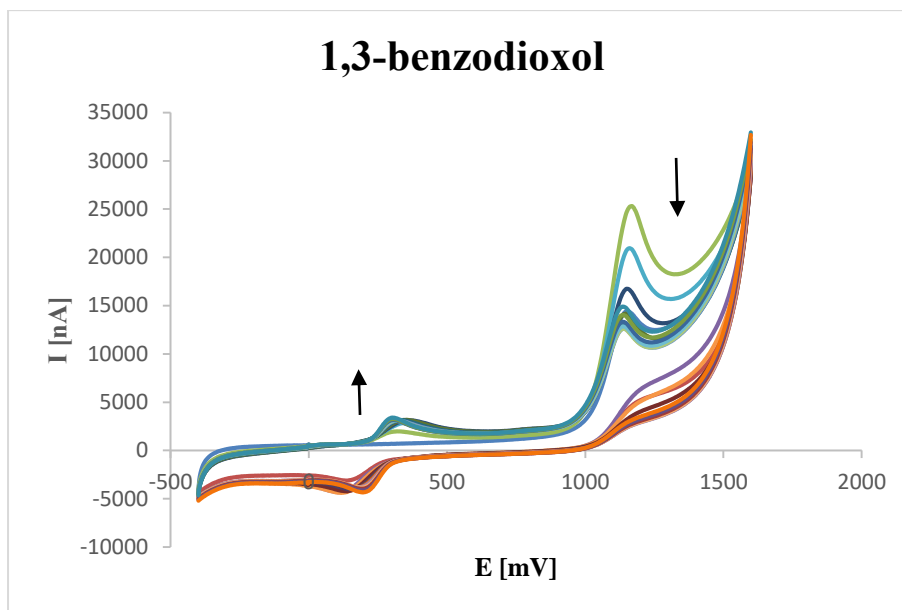
**Graf č. 20 :** Závislosť prúdu na koncentrácii 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmethanamínu



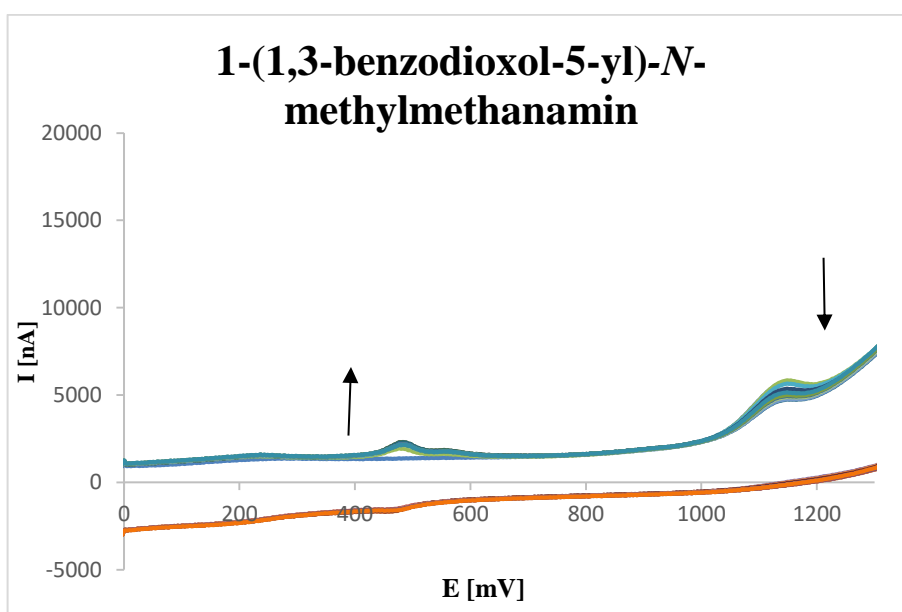
**Graf č. 21 :** Závislosť prúdu na koncentrácii JTE 907

#### 5.4 Elektropolymerácia

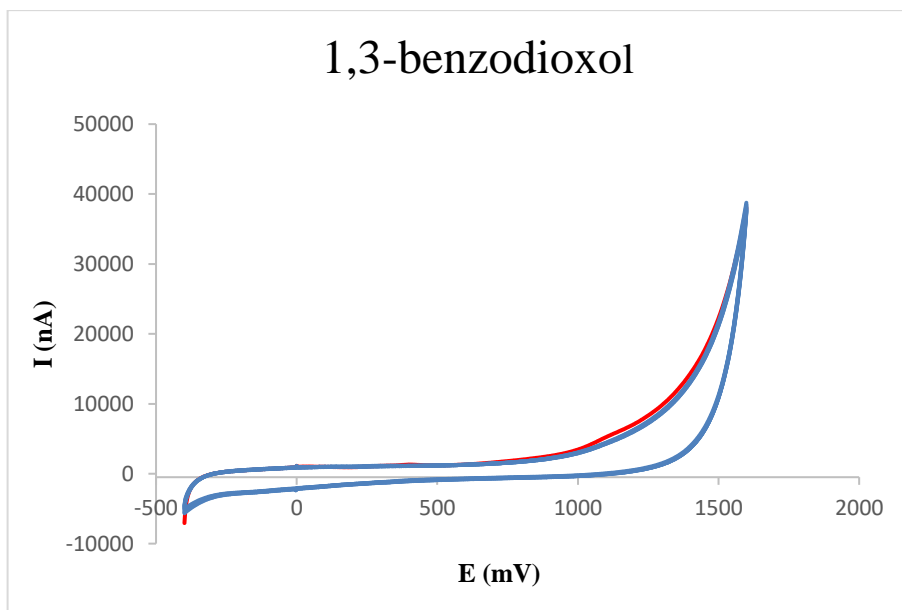
Metódou cyklickej voltametrie bola zmeraná závislosť prúdu anodického píku na počte opakovaní. Využitím cyklickej voltametrie je možné zistiť, či daná látka polymeruje na mernej elektróde. Na Obr. 12 pre 1,3-benzodioxol a Obr. 13 pre 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamín môžeme vidieť, že prúd hlavného anodického píku postupne klesal a narastali prúdy dvojice píkov pri nižších potenciáloch. Na polymeračný produkt sa adsorbuje pôvodný benzodioxol a zostáva tak viazaný na povrchu polymerom modifikovanej elektródy po skončení cyklickej polymerácie. Jeho prúdovú odozvu v čistom základnom elektrolyte je možné vidieť na Obr.14 pre 1,3-benzodioxol a Obr. 15 pre 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamín.



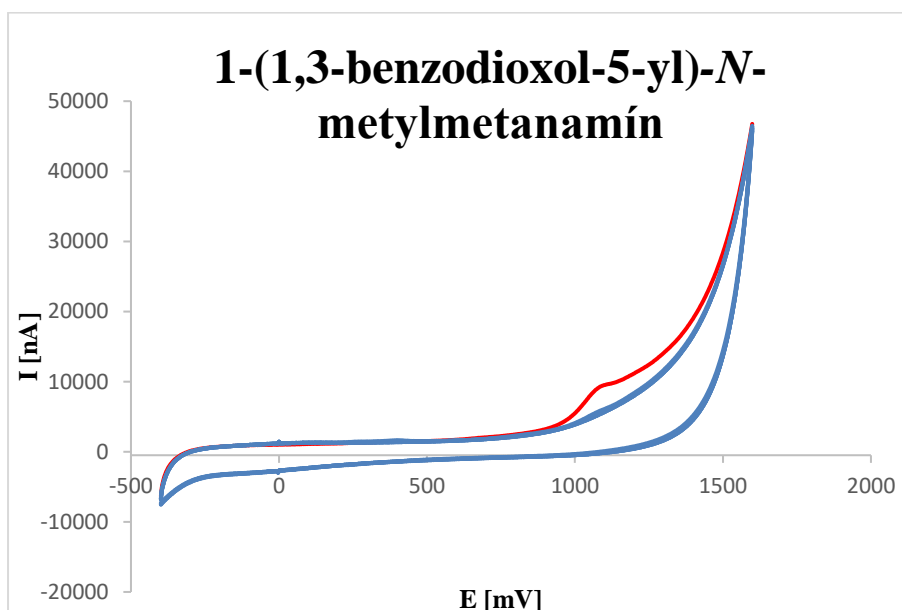
**Obr. 12:** Opakované cyklické voltamogramy 1,3-benzodioxolu ( $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ ) v Britton-Robinsonovom pufrí pH 6. Rýchlosť polarizácie  $100 \text{ mV/s}$ , 20 cyklov, šípky ukazujú zmenu intenzity prúdovej odozvy v opakovaných cykloch



**Obr. 13:** Opakované cyklické voltamogramy 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmethanamínu ( $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ ) v Britton-Robinsonovom pufrí pH 3. Rýchlosť polarizácie  $100 \text{ mV/s}$ , 20 cyklov, šípky ukazujú zmenu intenzity prúdovej odozvy v opakovaných cykloch



**Obr. 14:** Cyklický voltamogram základného elektrolytu – červená farba krivky predstavuje adsorpciu 1,3-benzodioxolu na mernú elektródu



**Obr. 15:** Voltamogram základného elektrolytu – červená farba krivky predstavuje adsorpciu 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmethanamínu na pracovnú elektródu

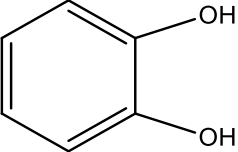
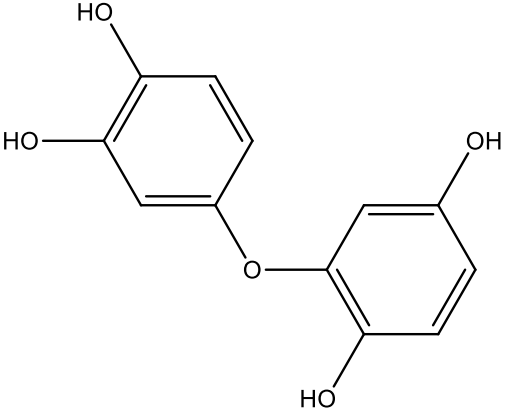
### 5.5 Potenciostatická elektrolýza a analýza pomocou hmotnostej spektrometrie

Pri detekcii produktov vznikajúcich oxidáciou 1,3-benzodioxolu a jeho derivátov v elektrochemickej cele pomocou hmotnostnej spektrometrie boli detekované ióny s  $m/z$  u štandardu i u produktov elektrolýzy. Pre štandard 1,3-benzodioxolu v kladnom i negatívnom ionizačnom móde nie je prítomná žiadna ionizovateľná skupina, preto nie je

v spektre hmota  $m/z$  123 viditeľná. Pre štandard 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamín sa v kladnom ionizačnom móde nachádzajú intenzívne ióny s hodnotami  $m/z = 135, 166$  a v negatívnom móde sa objavili ióny o menšej intenzite  $m/z = 164$ . Pre štandard JTE 907 sa v kladnom móde objavil intenzívny ión o hodnote  $m/z = 439$  a v zápornom ión o  $m/z = 437$ .

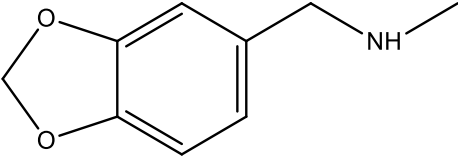
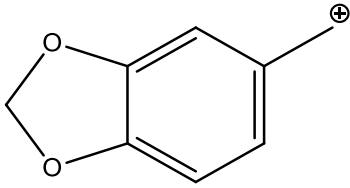
V tabuľke 9 sú navrhnuté štruktúry oxidačných produktov 1,3-benzodioxolu po elektrolýze pri 1200 mV, pretože u štandardu nebol žiaden pík súvisiaci s touto látkou (Príloha 1, Obr.1). Ďalej sú v tabuľke uvedené teoretické hodnoty  $m/z$  protónovaných i deprotonovaných molekúl. Tieto štruktúry sú navrhnuté na základe analýzy MS spektier oxidačných produktov a ich fragmentačných spektier, pri ktorých boli izolované určité ióny o hodnote  $m/z$  v príslušnom móde. Pre 1,3-benzodioxol bol použitý záporný mód, pretože v kladnom móde nebol žiadny odpovedajúci pík. V zápornom móde boli intenzívne ióny o hodnote  $m/z = 97, 195, 233$  (Príloha 1, Obr. 4,6). a menej intenzívny ión s  $m/z$  109. Izolovaný bol aj menej intenzívny ión  $m/z$  109 (Príloha 1, Obr. 3), ktorý bol veľmi nestály, čo mohlo súvisieť s radikálovou štruktúrou vznikajúceho fragmentu s  $m/z$  108. V tabuľke 9 sú štruktúry oxidačných produktov s  $m/z$  109, 233 navrhnuté na základe kolízneho spektra uvedených v Prílohe 1, Obr. 3 a 6.

**Tabuľka 9:** Navrhnuté štruktúry pre oxidačné produkty po elektrolýze 1,3-benzodioxolu a teoretické hodnoty  $m/z$  protónovaných a deprotonovaných molekúl

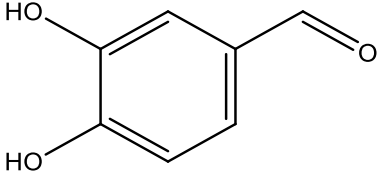
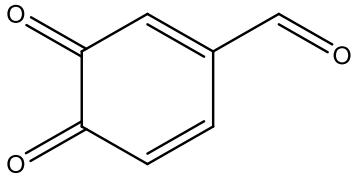
|   |                 |
|---|-----------------|
|  | $[M-H]^- = 109$ |
|  | $[M-H]^- = 233$ |

V tabuľke 10 sú zhrnuté oxidačné produkty 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamínu a jeho teoretické hodnoty  $m/z$ . Spektrum štandardu pre túto látku obsahuje ióny o  $m/z = 135, 166$  v kladnom móde (Príloha 2, Obr. 7) a v negatívnom móde (Príloha 2, Obr. 8) sa objavili ióny o menšej intenzite  $m/z = 164$ . V hmotnostnom spektre 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamínu oxidovanom 10 min pri potenciáli 1,15 V boli v kladnom móde pozorované ióny o hodnote  $m/z 137$  a  $139$ , ktoré sa v spektre štandardu nevyskytovali (Príloha 2, Obr. 9). Signál iónu  $m/z 137$  bol pozorovaný v spektre roztoku oxidovaného po dobu 30 minút pri 1,35 V. Po elektrolyze bol k roztoku 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamínu pridaný roztok 2,4-dinitrofenylhydrazínu a v MS spektre v negatívnom móde ESI bol pozorovaný ión o  $m/z 157$ , ktorý sa nenachádzal v roztoku štandardu s touto pridanou látkou (Príloha 2, Obr. 10). Pozitívna reakcia s 2,4-dinitrofenylhydrazínom dokazuje v oxidačnom produkte prítomnosť aldehydovej skupiny. Štruktúra chinónu tohto produktu bola preukázaná reakciou s *N*-acetylcysteínom, ktorý sa po prídavku k elektrolyzátu 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamínu naviazal na benzochinónový kruh príslušného oxidačného produktu za vzniku derivátu, ktorý v MS spektre poskytoval ión o  $m/z 298$  v negatívnom móde (Príloha 2, Obr. 11).

**Tabuľka 10:** Štruktúra pre 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamínu a jeho fragmentu

|   |                 |
|---|-----------------|
|  | $[M+H]^+ = 166$ |
|  | $[M+H]^+ = 135$ |

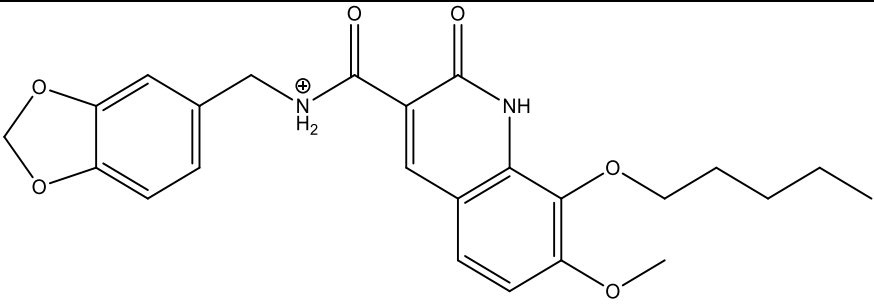
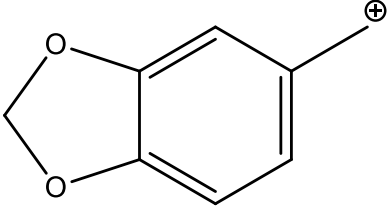
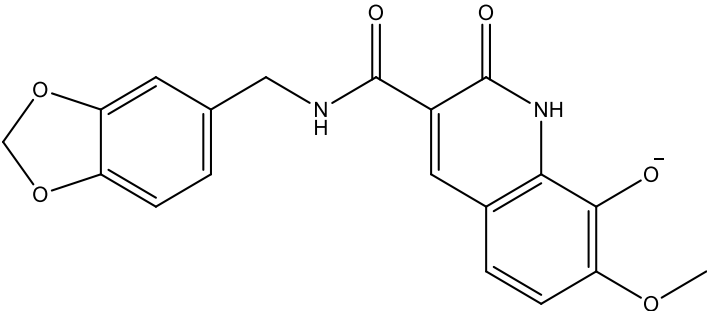
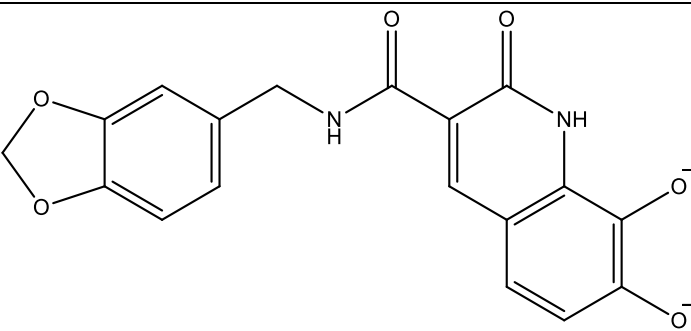
**Tabuľka 11:** Navrhnuté štruktúry oxidačných produktov 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamínu

|   |                 |
|---|-----------------|
|  | $[M+H]^+ = 139$ |
|  | $[M+H]^+ = 137$ |

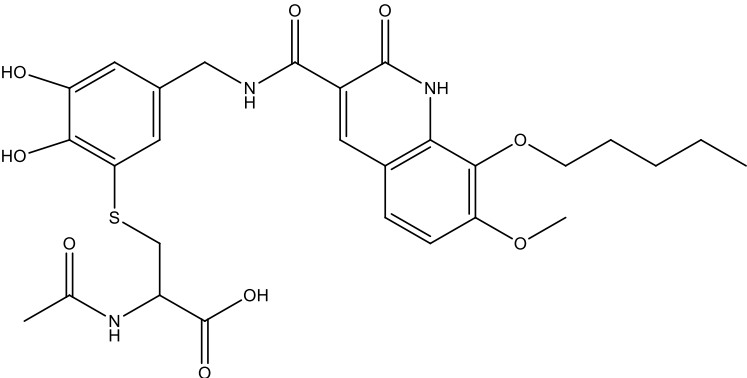
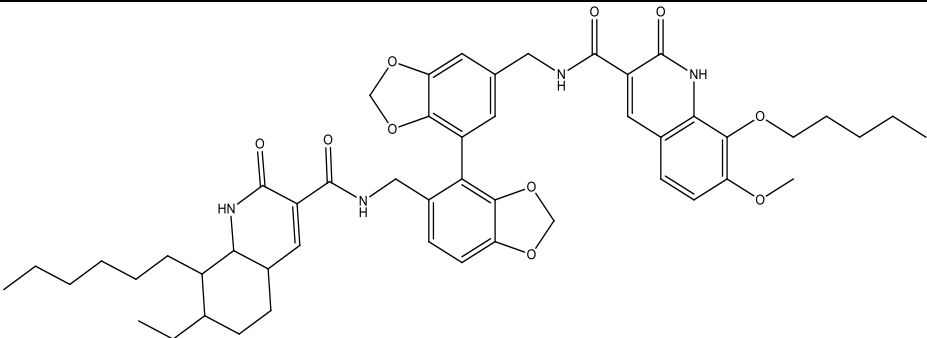
V tabuľke 12 sú navrhnuté štruktúry pre látku JTE 907 a teoretické hodnoty  $m/z$  pre protónované a deprotónované molekuly. V spektre štandardu tejto látky je hodnota  $m/z = 439$  v kladnom móde (Príloha 3, Obr. 13) a 437 v zápornom móde (Príloha 3, Obr. 14). Fragmentačné spektrum iónu 439 v pozitíve bol ión 135 (Príloha 3, Obr. 15), ktorý bol rovnaký aj u 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamínu, v negatíve sú prítomné ióny o  $m/z = 367$ , 352 čo predstavuje odštiepenie metylovej a pentylovej skupiny (Príloha 3, Obr. 16). Po elektrolýze pri 1300 mV a pridaní *N*-acetylcysteínu sa objavujú rovnaké ióny o  $m/z = 439$  a 437 (Príloha 3, Obr. 18, 19). Ďalej bola vykonaná aj izolácia menej intenzívnych iónov o  $m/z = 588$  a 877, aby sa zistilo, či aj tieto ióny prislúchajú stanovovanej látke. U fragmentu o  $m/z = 588$  je pravdepodobné, že na JTE 907 sa môže v para polohe naviazať *N*-acetylcysteín (Príloha 3, Obr. 20). Vo fragmentačnom spektre iónu o  $m/z = 877$  (Príloha 3, Obr. 21) sa nachádza ión o  $m/z = 439$ , čo je molekula JTE 907, čo znamená že táto látka môže dimerovať, ale je viacej pravdepodobné, že dimeruje v iónovom zdroji vzhľadom k tomu, že sa ión  $m/z$  877 nachádza i v spektre štandardu.



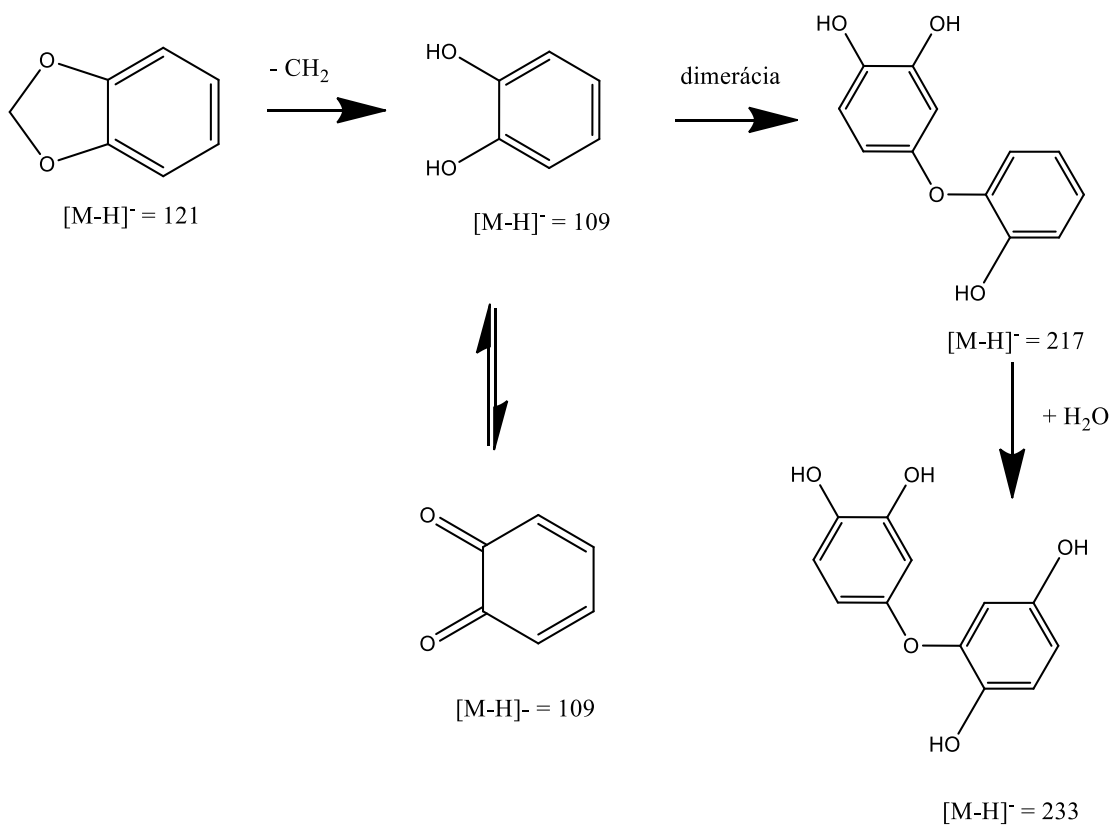
**Tabuľka 12:** Štruktúry iónu JTE 907 a štruktúry jeho fragmentových iónov,

|  |  |
|--|--|
|    | <p><math>[M+H]^+ = 439</math><br/> <math>M-H]^- = 437</math></p> |
|     | <p><math>[M+H]^+ = 135</math></p>                                |
|   | <p><math>[M-H]^- = 367</math></p>                                |
|  | <p><math>[M-H]^- = 352</math></p>                                |

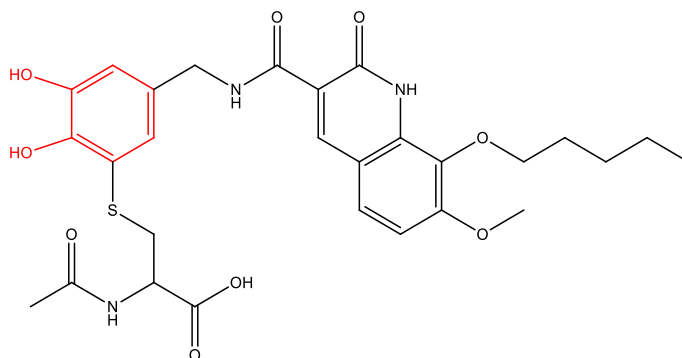
**Tabuľka 13:** Navrhnutá štruktúra iónu  $m/z$  587 produktu vytvoreného reakciou N-acetylcysteínu s oxidačným produktom JTE 907, štruktúra diméru JTE 907 o  $m/z$  877

|   |                 |
|---|-----------------|
|   | $[M-H]^- = 587$ |
|  | $[M+H]^+ = 877$ |

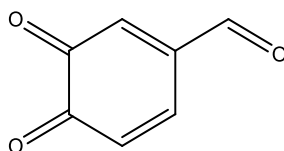
Mechanizmus oxidácie 1,3-benzodioxolu bol naznačený v mnohých článkoch, pri ktorých sa poukazuje na vznik katión radikálu na benzénovom jadre, zatiaľ čo metyléndioxy skupina bola zachovaná. Využitím potenciostatickej elektrolýzy 1,3-benzodioxolu a následnou analýzou oxidačných produktov pomocou hmotnostnej spektrometrie bol navrhnutý iný spôsobom oxidácie benzodioxolového kruhu. Z metyléndioxy skupiny sa odštiepi metylénová skupina za vzniku katecholu, ktorý môže dimerovať. Po následnej hydratácii diméru vzniká ión o hodnote  $m/z$  233. Zo skúmaných derivátov sa tento navrhnutý mechanizmus potvrdil u štruktúry syntetického kanabinoídu JTE 907 (vid'. Obr. 16), i u 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamínu. Avšak pri elektrolýze u 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamínu dochádza k oxidácii nielen 1,3-benzodioxolového kruhu na príslušný katechol, ktorý sa oxiduje na *o*-chinón, ale dochádza k odštiepeniu metylamínu za vzniku aldehydu (vid'. Obr. 17).



**Schéma 4:** Navrhnutý mechanizmus oxidácie benzodioxolového kruhu



**Obr. 16:** Oxidačný produkt látky JTE 907, vzniknutý katechol je označený červenou farbou



**Obr. 17:** Oxidačný produkt látky 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamínu

## 6. ZÁVER

Táto diplomová práca sa zaoberala štúdiou elektrochemického chovania 1,3-benzodioxolu a jeho derivátov. Zvolenými derivátmi boli 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetanamín a derivát patriaci do skupiny syntetických kanabinoïdov JTE 907. Elektrochemické správanie zvolených látok bolo skúmané cyklickou voltametrou, diferenčne pulznou voltametrou a taktiež analýzou elektrochemicky generovaných oxidačných produktov analyzovaných látok pomocou hmotnostnej spektrometrie.

Cyklickou voltametrou bola sledovaná závislosť prúdu na polarizácii elektródy, pri ktorej bolo zistené, že rýchlosť elektrochemickej reakcie 1,3-benzodioxolu a JTE 907 je riadená adsorpciou látky na povrch elektródy. Ďalej bola pri opakovaných cykloch pozorovaná elektropolymerácia látky na povrchu elektródy U derivátu 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetanamínu je dej riadený difúziou, ktorá je ovplyvnená adsorpciou. Zo závislosti potenciálu na rýchlosti polarizácie elektródy bolo zistené, že anodická oxidácia 1,3-benzodioxolu a jeho derivátov je ireverzibilným dejom.

Diferenčne pulznou voltametrou bola skúmaná závislosť prúdu na koncentrácii analytu. Pomocou regresnej rovnice kalibračnej krivky boli vypočítané medze detekcie pre stanovované látky:  $1,766 \cdot 10^{-6}$  mol/l pre 1,3-benzodioxol,  $6,302 \cdot 10^{-6}$  mol/l pre 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetanamín a  $4,857 \cdot 10^{-6}$  mol/l pre JTE 907.

Potenciostatickou elektrolýzou 1,3-benzodioxolu a jeho derivátov a následnou analýzou oxidačných produktov pomocou hmotnostnej spektrometrie sa zistilo, že mechanizmus oxidácie benzodioxolového kruhu súvisí s odštiepením metylénu s metyléndioxy skupiny za vzniku katecholu, ktorý sa ďalej oxiduje na *o*-chinón. Tento mechanizmus bol potvrdený aj u jeho derivátov. U derivátu 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetanamínu súčasne dochádza k oxidatívne odštiepeniu metylamínu za vzniku aldehydu. Porovnanie produktov elektrochemickej oxidácie 1,3-benzodioxolu a jeho derivátov s produktom metabolizmu 1,3-benzodioxolu publikovaným v práci [44] poukazuje na podobnosť oboch procesov. Je teda možné predpokladať, že výsledky štúdia elektrochemického chovania benzodioxolových derivátov pri elektrochemickej oxidácii by mohli prispieť k pochopeniu metabolizmu návykových látok ako je extáza.

## 7. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Faber, H., Vogel, M. & Karst, U. Electrochemistry/mass spectrometry as a tool in metabolism studies-A review. *Analytica Chimica Acta* **834**, 9–21 (2014).
2. Dictionary.com ‘drug,’ in Dictionary.com Unabridged. Source location: Random House, Inc. <http://www.dictionary.com/browse/drug>. Available: <http://www.dictionary.com/>. citované: April 5, 2018. No Title.
3. Crocq, M. A. Alcohol, nicotine, caffeine, and mental disorders. *Dialogues Clin Neurosci* **5**, 175–185 (2003).
4. Hill, S. L. & Thomas, S. H. L. Clinical toxicology of newer recreational drugs. *Clinical Toxicology* (2011).
5. Obzor, P. Látok bez duševnej poruchy. 273–282 (2006).
6. KEMPNÝ, Ondřej. Trendy v oblasti detekce drog. Zlín, 2008. bakalářská práce (Bc.). Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta aplikované informatiky.
7. ŠTABLOVÁ, R. *Drogy, kriminalita a prevence. 2. rozš. vyd. Praha: Policejní akademie České republiky.* (1999).
8. Carroll, F. I., Lewin, A. H., Mascarella, S. W., Seltzman, H. H. & Reddy, P. A. Designer drugs: A medicinal chemistry perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1248**, 18–38 (2012).
9. Wohlfarth, A. & Weinmann, W. Bioanalysis of new designer drugs. *Bioanalysis* **2**, 965–979 (2010).
10. Wohlfarth, A. & Weinmann, W. Bioanalysis of new designer drugs. *Bioanalysis* (2010).
11. <https://www.dea.gov/divisions/hq/2013/hq062613.shtml>.
12. Marciano, M. A., Panicker, S. X., Liddil, G. D., Lindgren, D. & Sweder, K. S. Development of a Method to Extract Opium Poppy (*Papaver somniferum* L.) DNA from Heroin. *Sci Rep* **8**, 1–15 (2018).
13. Malvey, T. C. & Armsey, T. D. Tetrahydrogestrinone: The discovery of a designer steroid. *Curr Sports Med Rep* **4**, 227–230 (2005).

14. Zaitsu, K. *et al.* Determination of the metabolites of the new designer drugs bk-MBDB and bk-MDEA in human urine. *Forensic Sci Int* **188**, 131–139 (2009).
15. U.S Drug Enforcement Administration. Drugs of Abuse 2017 Edition: A DEA Resource Guide. *US Dep Justice* 94 (2017).
16. Spiller, H. A., Ryan, M. L., Weston, R. G. & Jansen, J. Clinical experience with and analytical confirmation of ‘bath salts’ and ‘legal highs’; (synthetic cathinones) in the United States. *Clin Toxicol (Philadelphia, Pa)* **49**, 499–505 (2011).
17. Anizan, S. *et al.* 3,4-Methylenedioxypropylone (MDPV) and metabolites quantification in human and rat plasma by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Anal Chim Acta* **827**, 54–63 (2014).
18. Meyer, M. R., Du, P., Schuster, F. & Maurer, H. H. Studies on the metabolism of the  $\alpha$ -pyrrolidinophenone designer drug methylenedioxy-propylone (MDPV) in rat and human urine and human liver microsomes using GC-MS and LC-high-resolution MS and its detectability in urine by GC-MS. *J Mass Spectrom* **45**, 1426–1442 (2010).
19. Slovakia, M. Úsmev lieči - konope lieči. Available at: <http://www.medicann.sk/endokannabinoidny-system-tela-alebo-ako-je-nase-telo-postavene-pre-konope/>.
20. Iwamura, H., Suzuki, H., Ueda, Y., Kaya, T. & Inaba, T. In Vitro and in Vivo Pharmacological Characterization of JTE- 907, a Novel Selective Ligand for Cannabinoid CB 2 Receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **296**, 420–425 (2001).
21. European Monitoring Centre for Drugs and Drug - Synthetic cannabinoids and ‘Spice’ drug profile. (2010). Available at: <http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/synthetic-cannabinoids>.
22. Ueda, Y., Miyagawa, N., Matsui, T., Kaya, T. & Iwamura, H. Involvement of cannabinoid CB2 receptor-mediated response and efficacy of cannabinoid CB2 receptor inverse agonist, JTE-907, in cutaneous inflammation in mice. *Eur J Pharmacol* **520**, 164–171 (2005).

23. Maekawa, T., Nojima, H., Kuraishi, Y. & Aisaka, K. The cannabinoid CB2receptor inverse agonist JTE-907 suppresses spontaneous itch-associated responses of NC mice, a model of atopic dermatitis. *Eur J Pharmacol* **542**, 179–183 (2006).
24. Kreth, K.-P., Kovar, K.-A., Schwab, M. & Zanger, U. M. Identification of the Human Cytochromes P450 Involved in the Oxidative Metabolism of ‘Ecstasy’ - Related Designer Drugs. *Biochem.Pharmacol.* **59**, 1563–1571 (2000).
25. De La Torre, R. *et al.* Human Pharmacology of MDMA: Pharmacokinetics, Metabolism, and Disposition. in *Therapeutic Drug Monitoring* **26**, 137–144 (2004).
26. Hakeminen, N. *et al.* .....2 2.2. I. 1–21 (2007).
27. Pizarro, N. *et al.* Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry and analysis of enantiomers by capillary electrophoresis. *J Anal Toxicol* **26**, 157–65 (2002).
28. Milhazes, N. *et al.* Electrochemical and spectroscopic characterisation of amphetamine-like drugs: Application to the screening of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its synthetic precursors. *Anal Chim Acta* **596**, 231–241 (2007).
29. Garrido, E. M. P. J., Garrido, J. M. P. J., Milhazes, N., Borges, F. & Oliveira-Brett, A. M. Electrochemical oxidation of amphetamine-like drugs and application to electroanalysis of ecstasy in human serum. *Bioelectrochemistry* **79**, 77–83 (2010).
30. Demets, G. J.-F. Cucurbiturils. *Quim Nov* **30**, 1313–1322 (2007).
31. Masson, E., Ling, X., Joseph, R., Kyeremeh-Mensah, L. & Lu, X. Cucurbituril chemistry: a tale of supramolecular success. *RSC Adv* **2**, 1213–1247 (2012).
32. Lu, L., Zhu, S., Zhang, H., Li, F. & Zhang, S. Theoretical study of complexation of resveratrol with cyclodextrins and cucurbiturils: structure and antioxidative activity. *RSC Adv* **5**, 14114–14122 (2015).
33. Tadini, M. C. *et al.* Developing electrodes chemically modified with cucurbit[6]uril to detect 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) by voltammetry. *Electrochim Acta* **121**, 188–193 (2014).

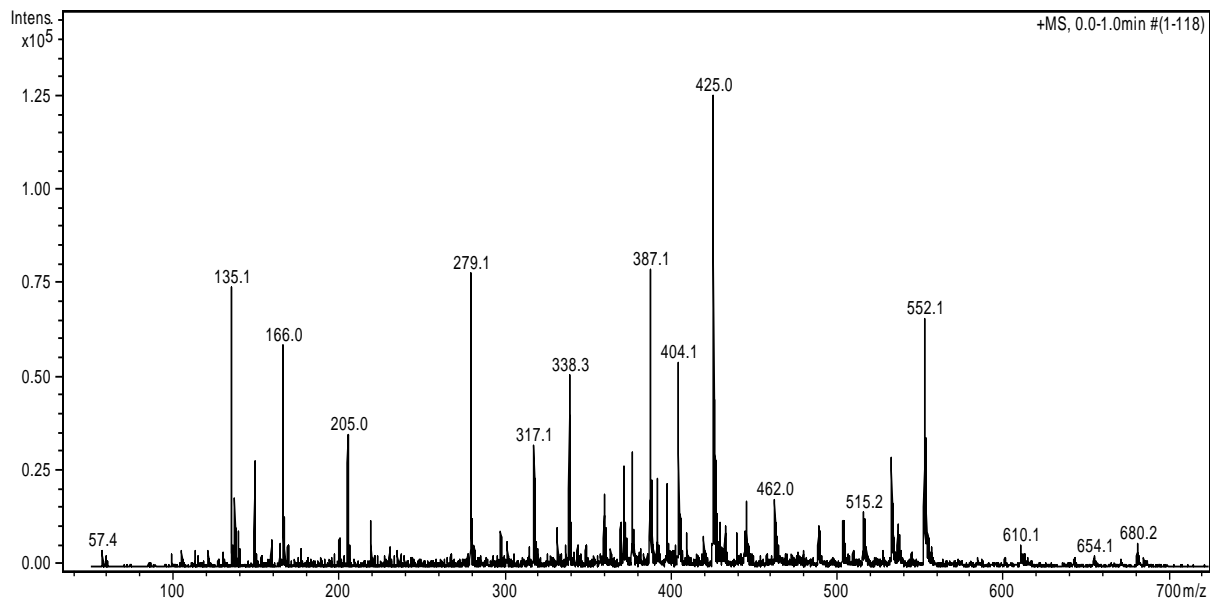
34. McGaw, L. J., Jäger, A. K. & van Staden, J. Antibacterial, anthelmintic and anti-amoebic activity in South African medicinal plants. *J Ethnopharmacol* **72**, 247–263 (2000).
35. Rotating, C. & Crop, I. N. Vplyv Atoniku a Pentakeepu-V na produkčné parametre repy cukrovej a plodiny rotujúcej v osevnom postupe. 174–177 (2011).
36. de Gives, P. M., Arellano, M. L., Hernández, E. L. & Marcelino, L. A. Plant extracts: a potential tool for controlling animal parasitic nematodes. *Biosph* 119–131 (2012).
37. Solecka, J., Zajko, J., Postek, M. & Rajnisz, A. Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Central European Journal of Biology* **7**, 373–390 (2012).
38. The Editors of Encyclopaedia Britannica. Alkaloid. (2017). Available at: <https://www.britannica.com/science/alkaloid>.
39. Schiff, P. L. BOOK REVIEWS MANFRED HESSE . Alkaloids : Nature ' s Curse or Blessing ? **67**, 2002–2003 (2003).
40. Murray, M. Mechanisms of inhibitory and regulatory effects of methylenedioxyphenyl compounds on cytochrome P450-dependent drug oxidation. *Curr Drug Metab* **1**, 67–84 (2000).
41. Murray, M. Mechanisms of inhibitory and regulatory effects of methylenedioxyphenyl compounds on cytochrome P450-dependent drug oxidation. *Curr Drug Metab* (2000).
42. Attia, M. I., Kansoh, A. L. & El-Brollosy, N. R. Antimicrobial pyrimidinones II: Synthesis and antimicrobial evaluation of certain novel 5,6-disubstituted 2-(substituted amino)alkylthiopyrimidin-4(3H)-ones. *Monatshefte fur Chemie* **145**, 1825–1837 (2014).
43. Kumar, S. A REVIEW ON ANTICONVULSANT ACTIVITY OF 1, 3-BENZODIOXOLE RING SYSTEM BASED COMPOUNDS Sagar Kumar S.D. College of Pharmacy and Vocational Studies, Muzaffarnagar, Uttar Pradesh, India. **4**, 3296–3303 (2013).



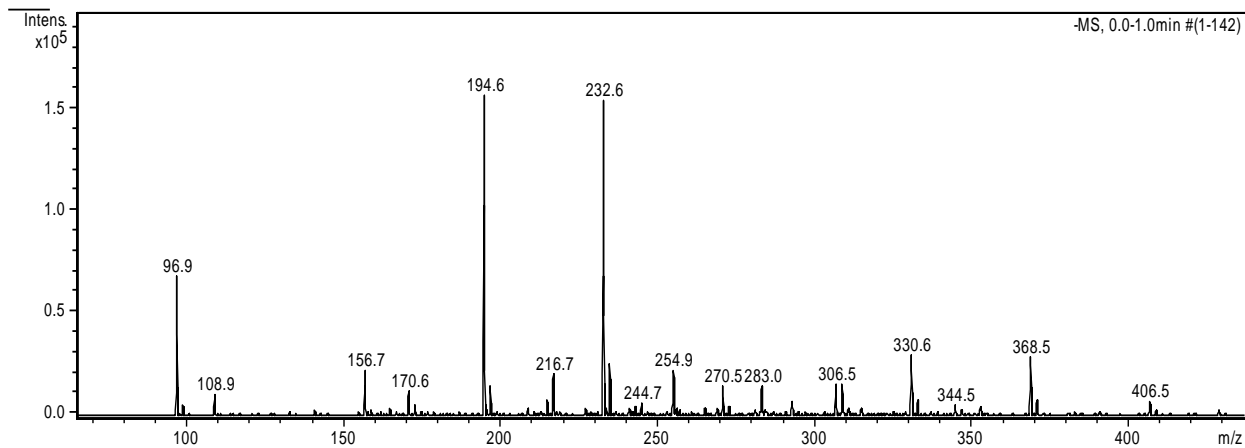
44. Casida, J. E., Engel, J. L., Essac, E. G., Kamienski, F. X. & Kuwatsuka, S. Methylene-C14-Dioxyphenyl Compounds: Metabolism in Relation to Their Synergistic Action. *Science* (80- ) **153**, 1130–1133 (1966).
45. David K. Gosser Jr.-Cyclic Voltammetry\_ Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms-Wiley-VCH (1993).pdf.

## 8. PRÍLOHY

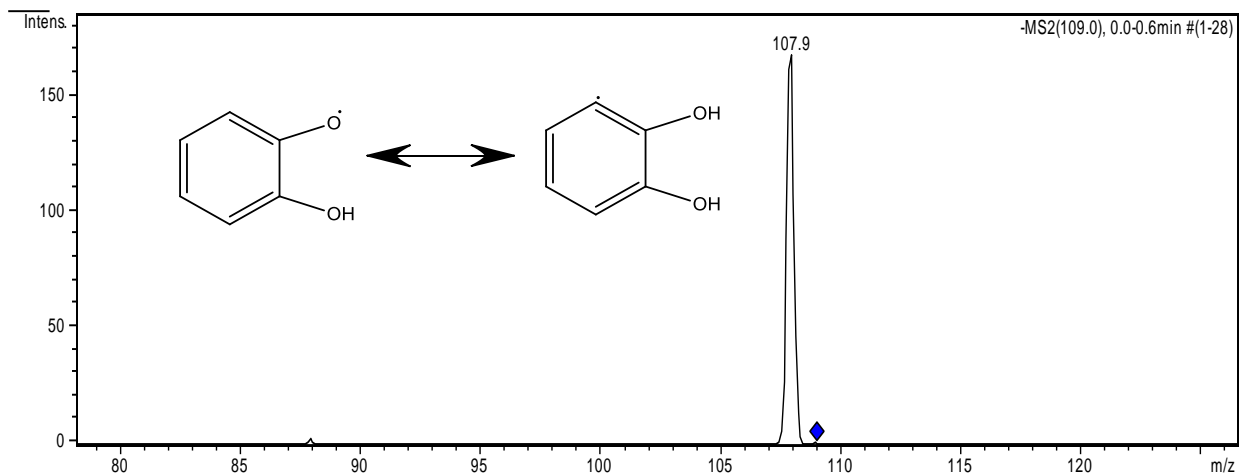
### Príloha 1: Hmotnostné spektrá 1,3-benzodioxolu



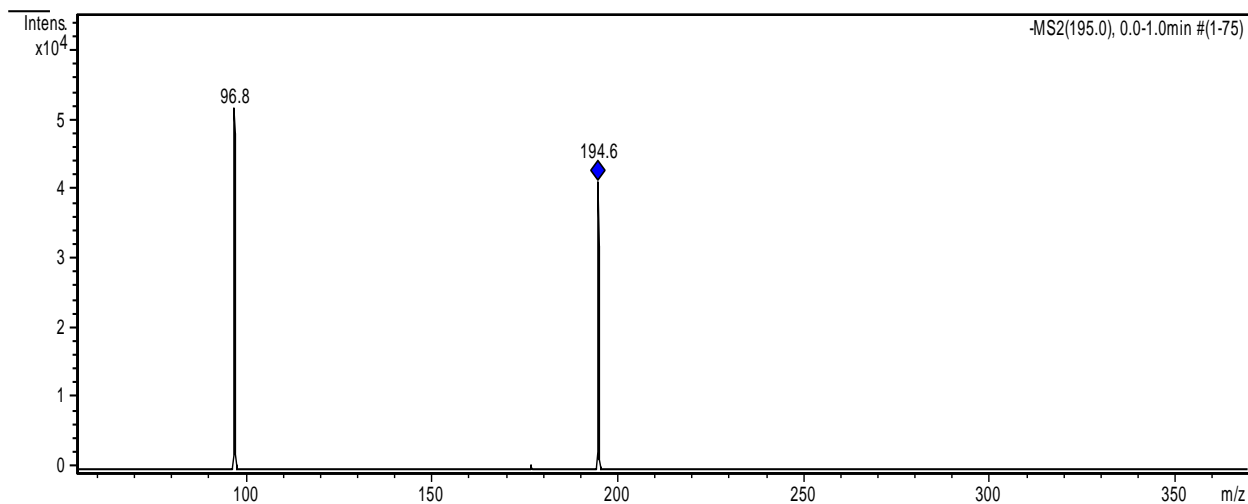
Obr. 1: MS štandardu 1,3-benzodioxolu, ESI+



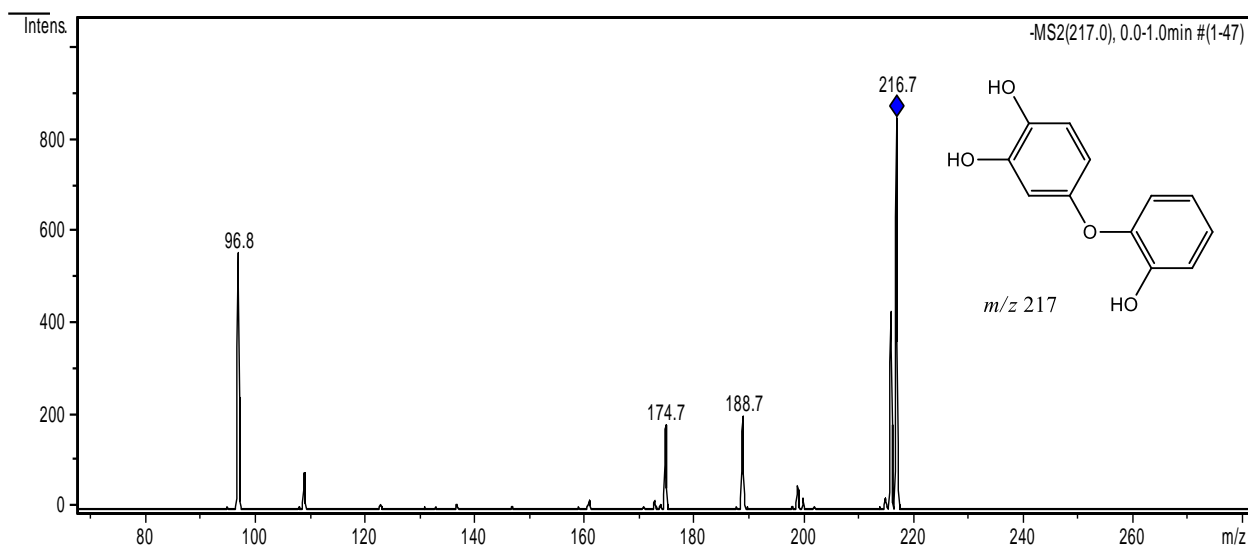
Obr. 2: MS elektrolyzátu 1,3-benzodioxolu po oxidácii pri 1,2 V, ESI-



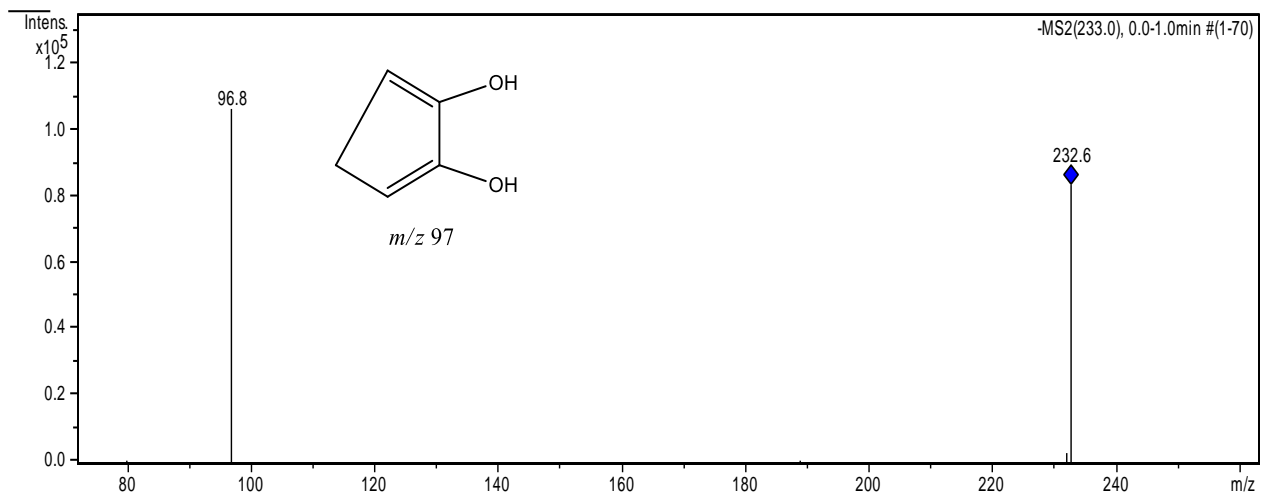
**Obr. 3:** MS elektrolyzátu 1,3-benzodioxolu: MS/MS íonu  $m/z$  108, ESI-



**Obr. 4:** MS elektrolyzátu 1,3-benzodioxolu: MS/MS íonu  $m/z$  195, ESI-

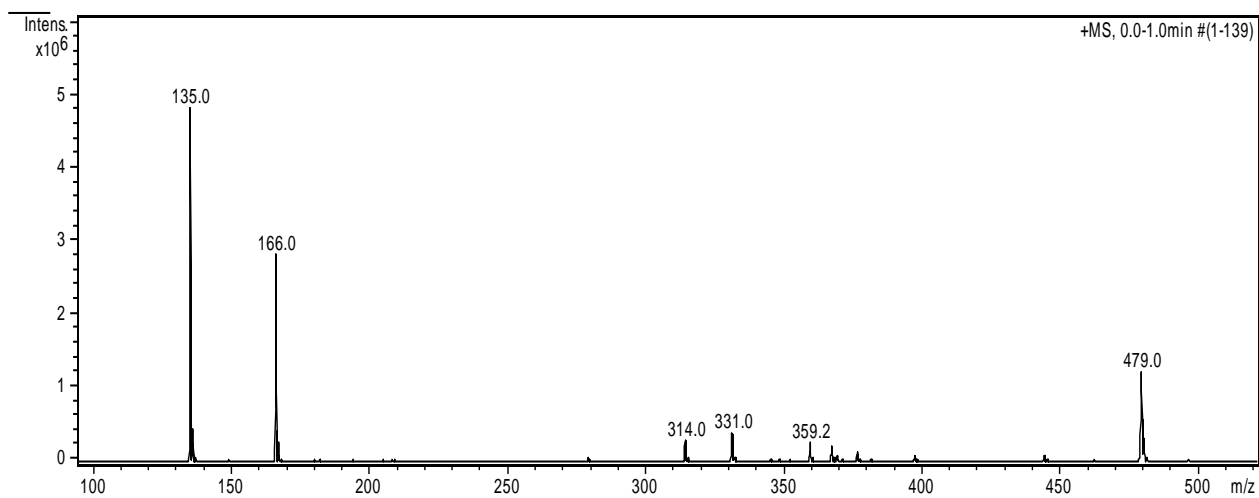


**Obr. 5:** MS elektrolyzátu 1,3-benzodioxolu: MS/MS íonu  $m/z$  217, ESI-

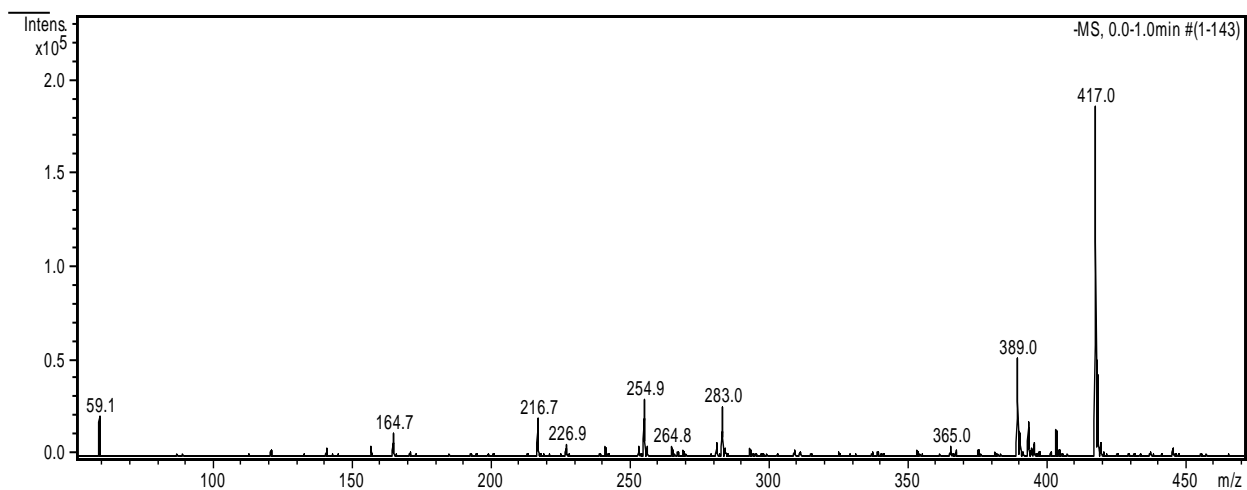


**Obr. 6:** MS elektrolyzáu 1,3-benzodioxolu: MS/MS íonu *m/z* 233, ESI-

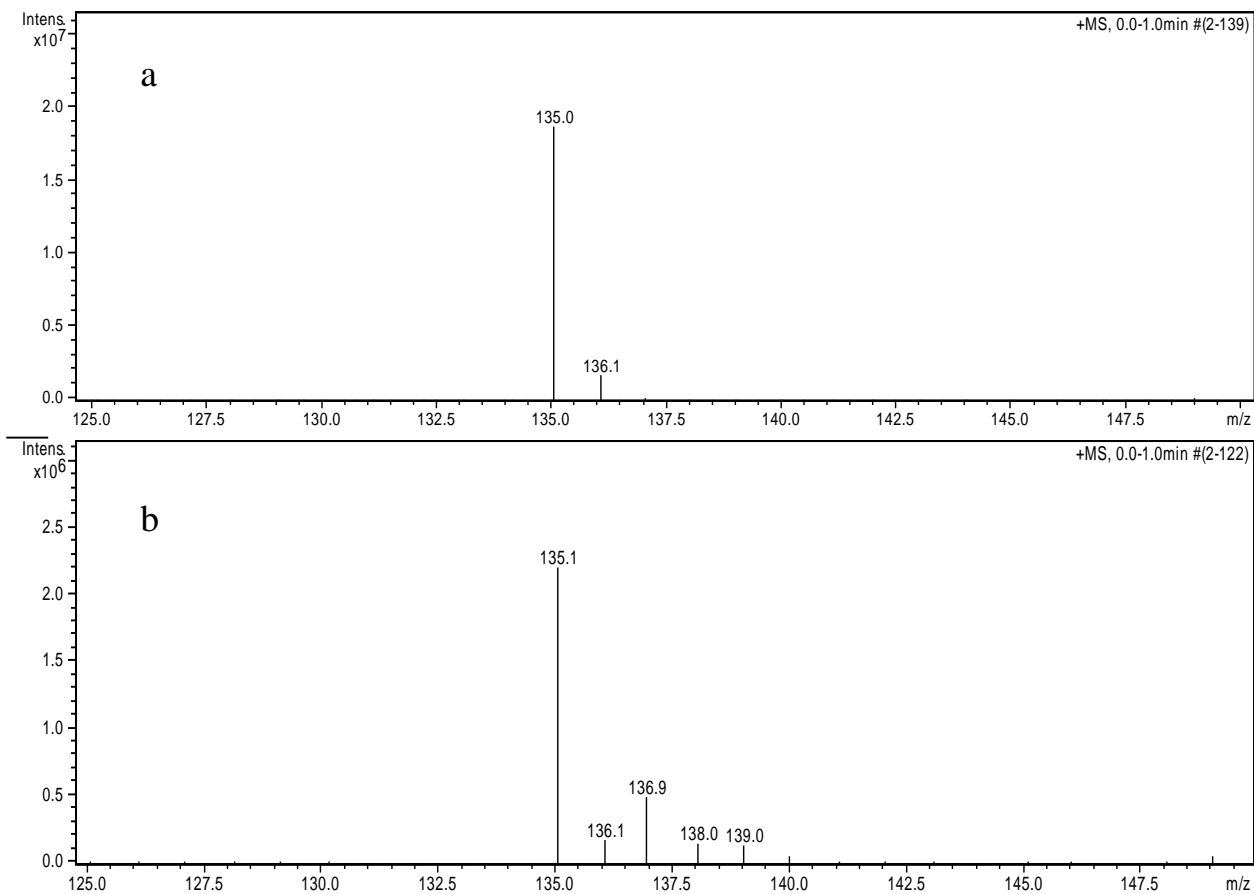
## Príloha 2: Hmotnostné spektrá 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamínu



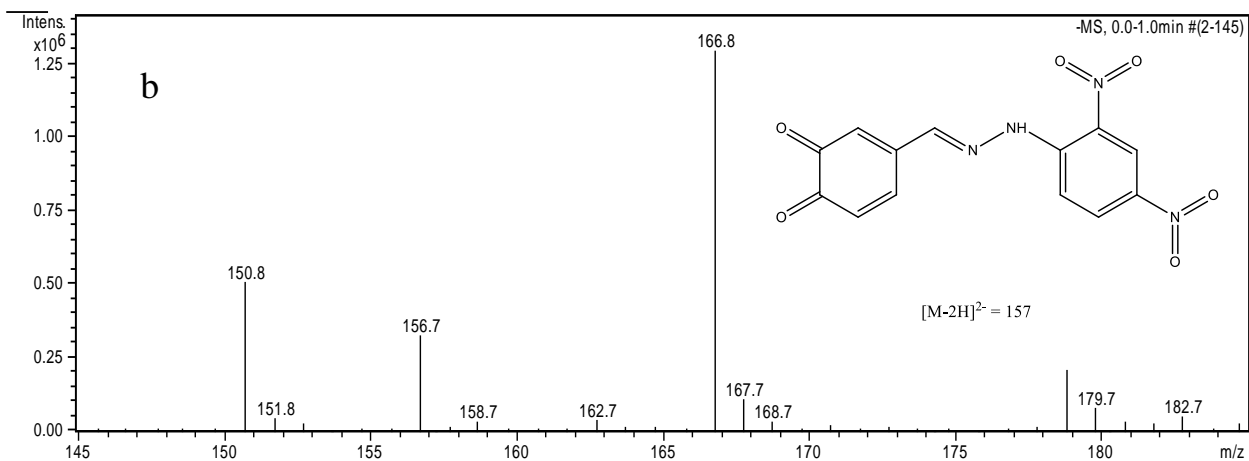
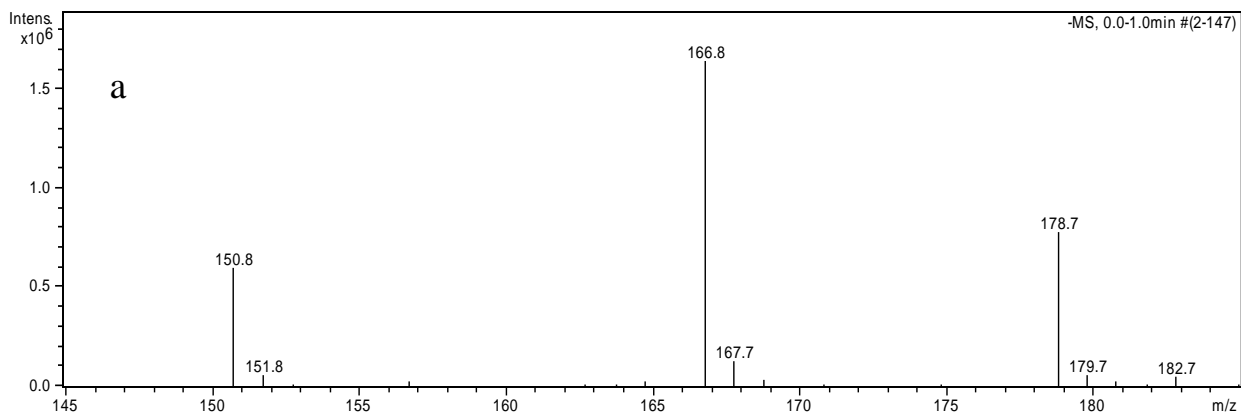
**Obr. 7:** MS štandardu 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamínu, ESI+



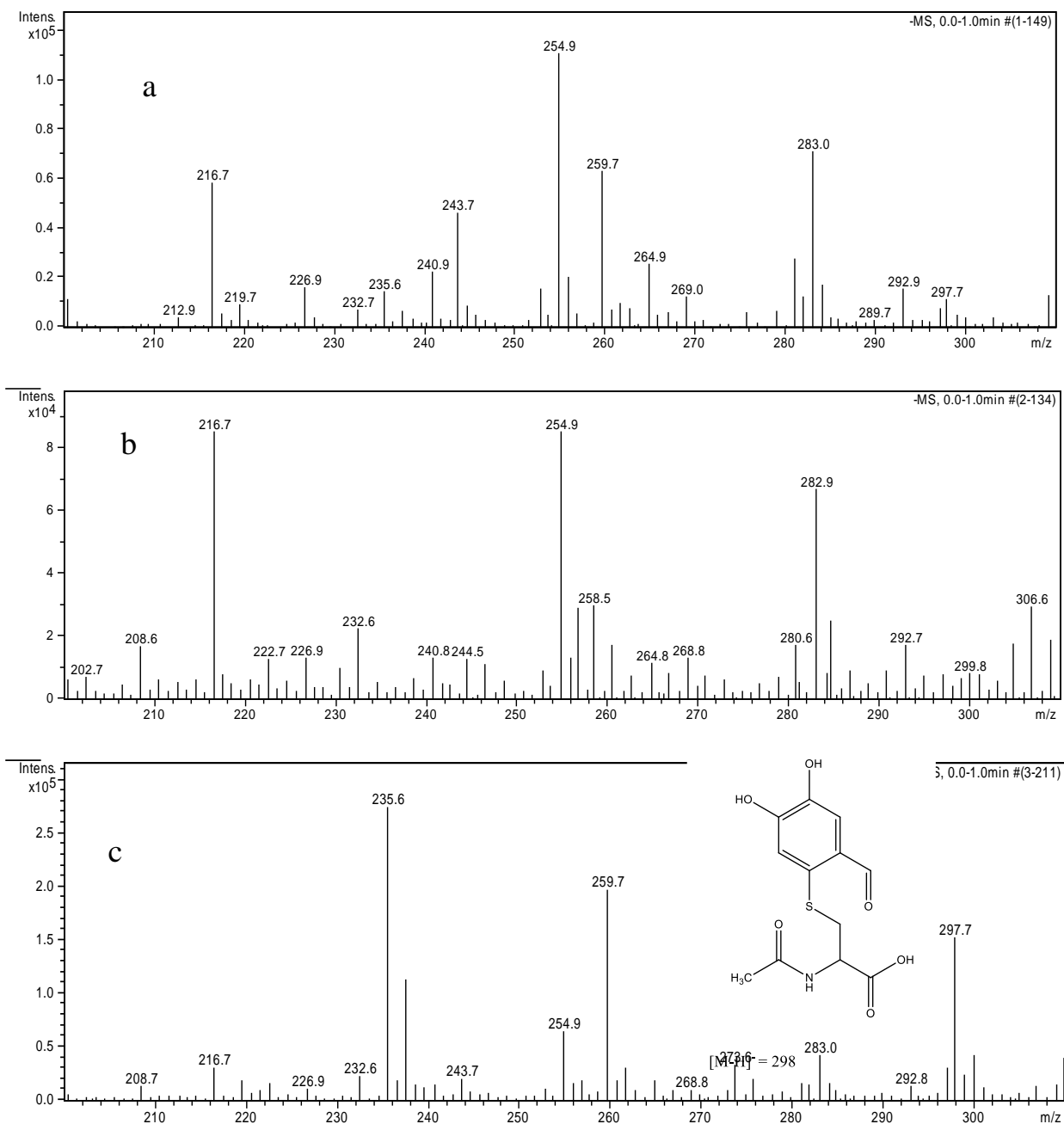
**Obr. 8:** MS štandardu 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamínu, ESI-



**Obr. 9:** Výrez z MS spektra 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-methylmetanamínu ( $c = 0,1$  mmol/l) v 25 mmol/l octanovom pufrí s pH 6 a 50% acetonitrilu: (a) pred, (b) po oxidácii 10 min pri 1,15 V na uhlíkovej štetinkovej elektróde, ESI+



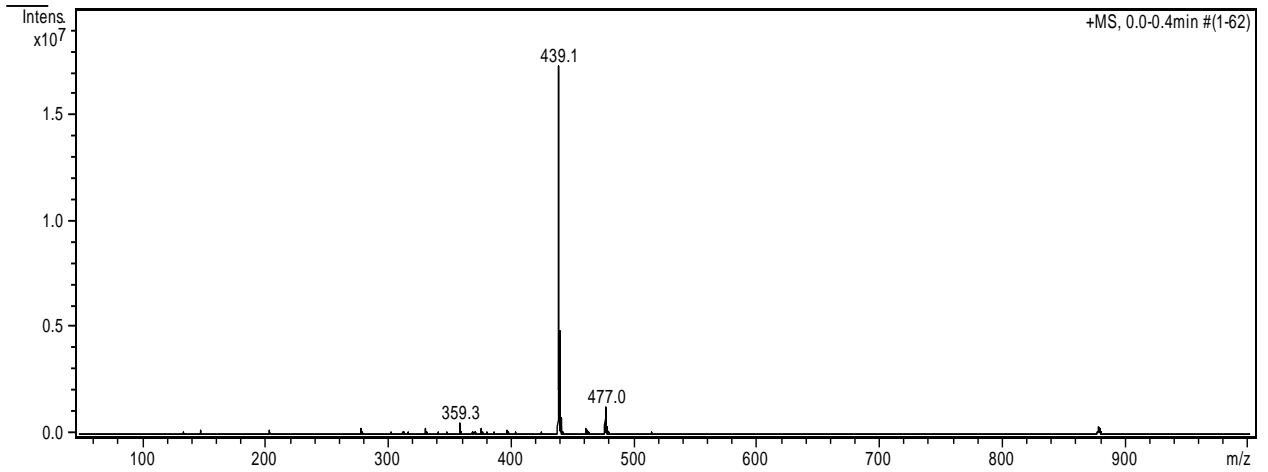
**Obr. 10:** MS roztoku 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-metylmetylamínu ( $c = 0,1 \text{ mmol/l}$ ) v 25 mmol/l octanovom pufri s pH 6 a 50% acetonitrilu: (a) pred, (b) po oxidácii 30 min pri 1,35 V na uhlíkovej štetinkovej elektróde, ESI-



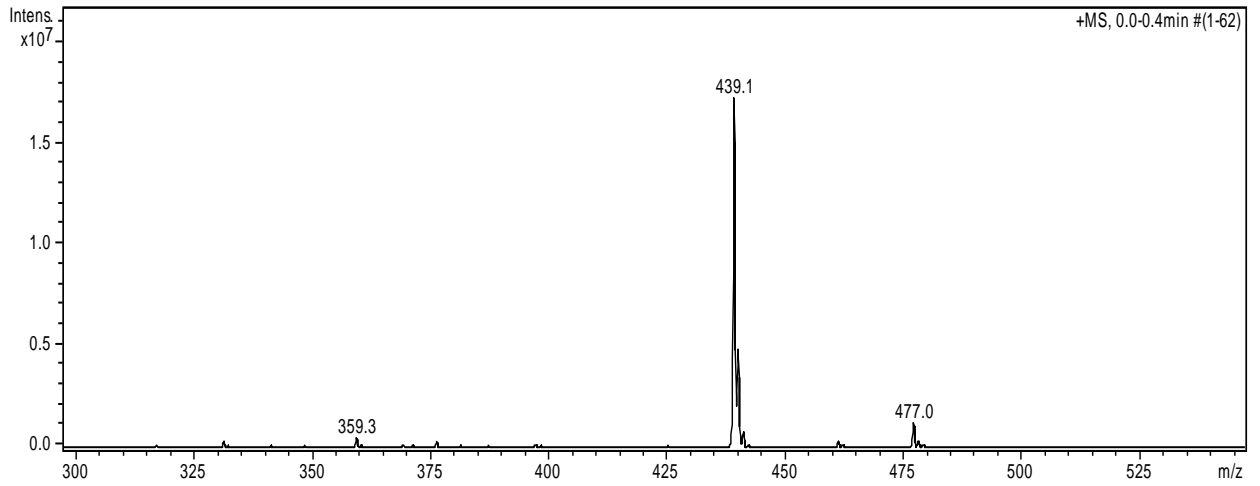
**Obr. 11:** MS roztoku 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-*N*-methylmetanaminu ( $c = 0,1$  mmol/l) v 25 mmol/l octanovom pufrí s pH 6 a 50% acetonitrilu: (a) s prídavkom *N*-acetylcysteínom pred oxidáciou, (b) po oxidácii 10 min pri 1,15 V bez prídavku *N*-acetylcystínu, (c) po oxidácii 10 min pri 1,15 V s prídavkom *N*-acetylcysteínom, ESI-



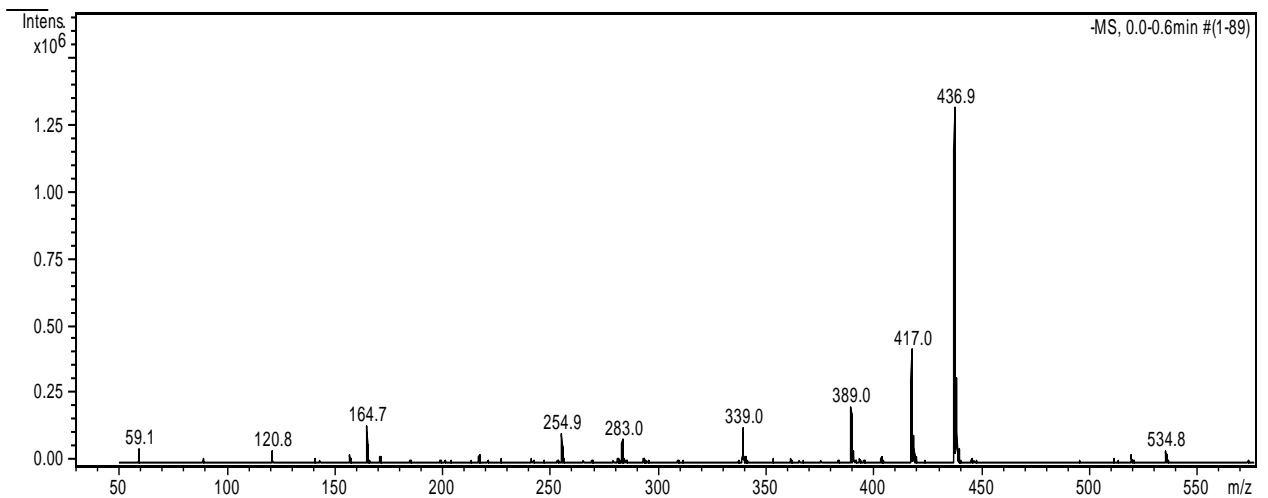
### Príloha 3: Hmotnostné spektrá látky JTE 907



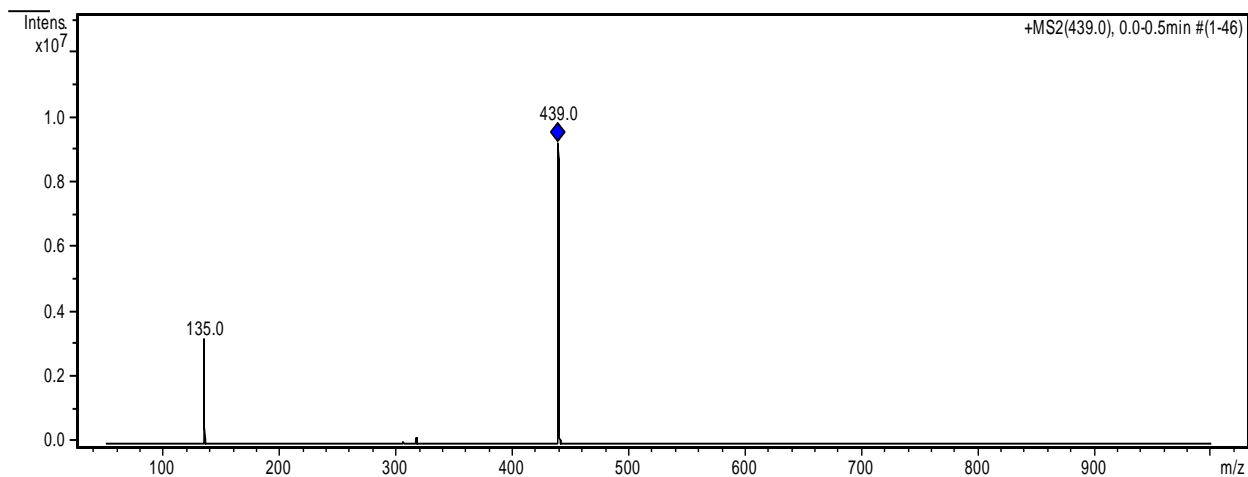
Obr. 12: MS štandardu JTE 907, ESI+



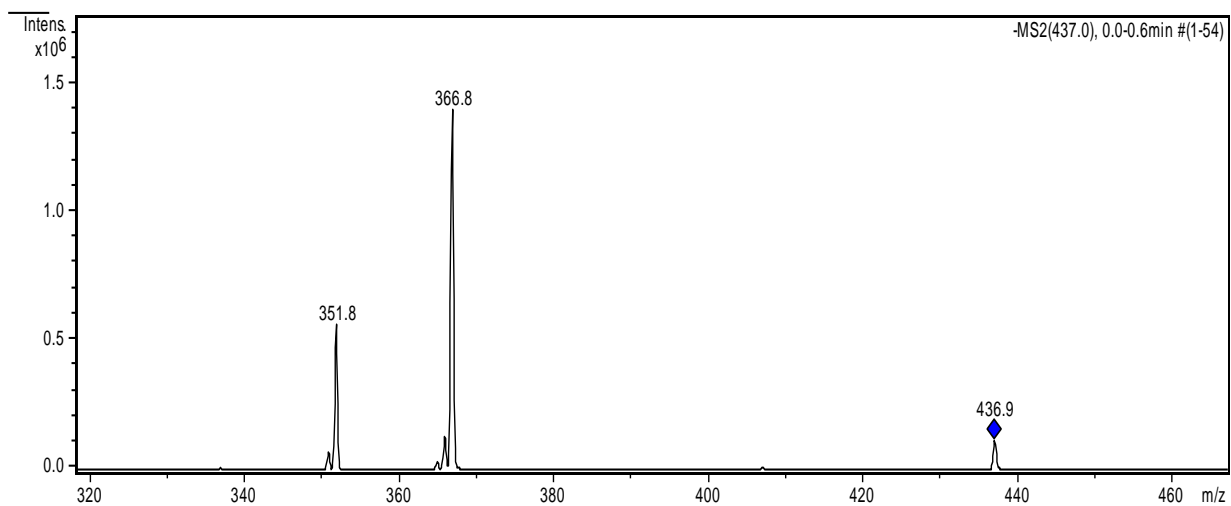
Obr. 13: MS štandardu JTE 907, ESI+



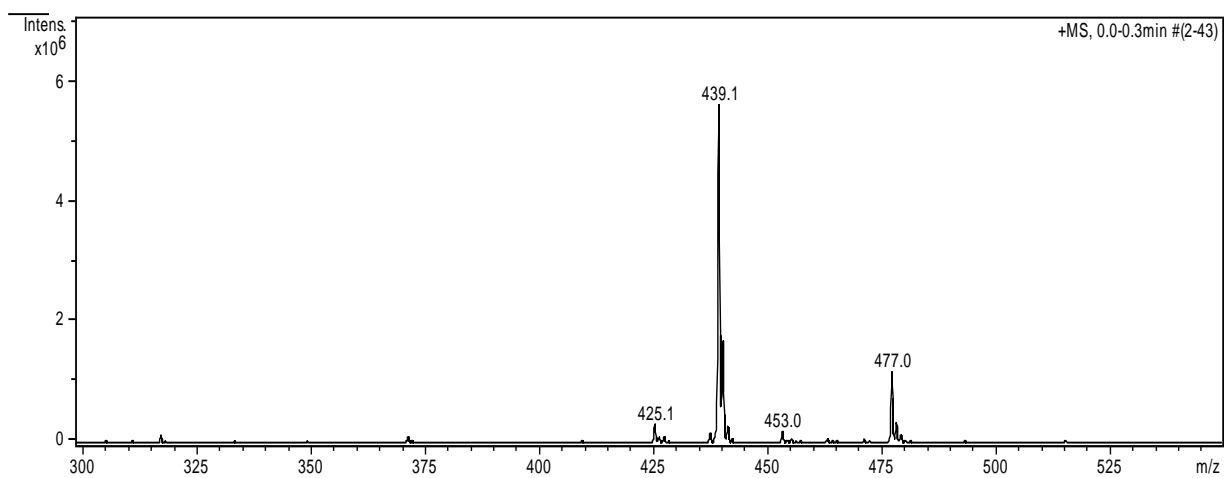
Obr. 14: MS štandardu JTE 907, ESI-



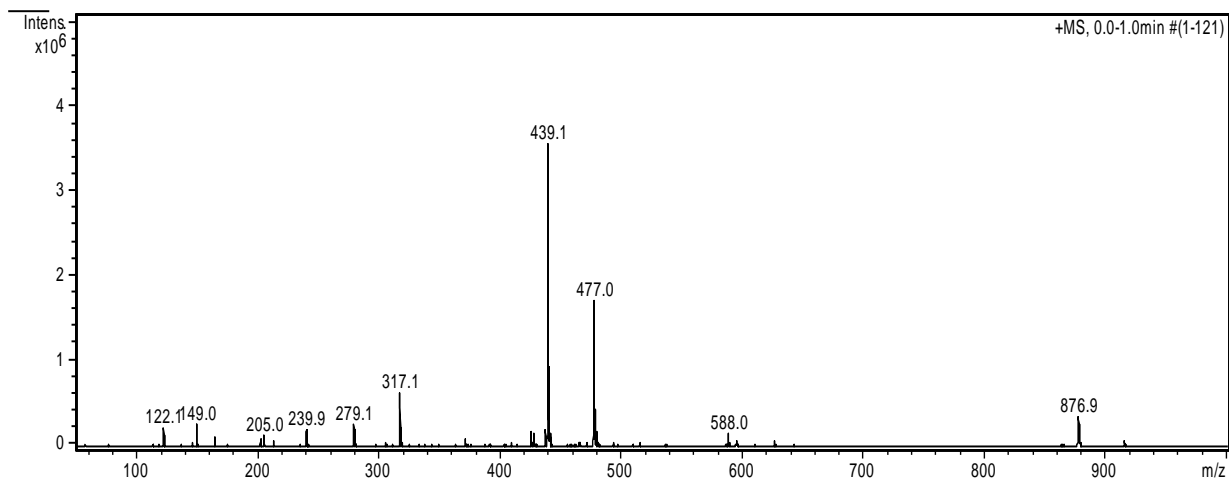
**Obr. 15:** MS/MS iónu  $m/z$  439, ESI+



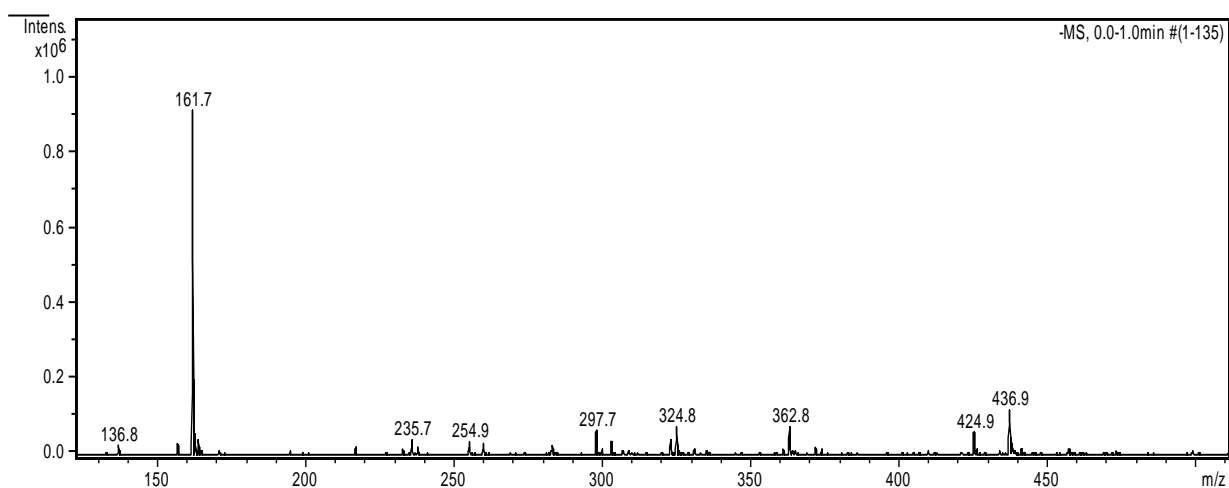
**Obr. 16:** MS/MS iónu  $m/z$  437, ESI-



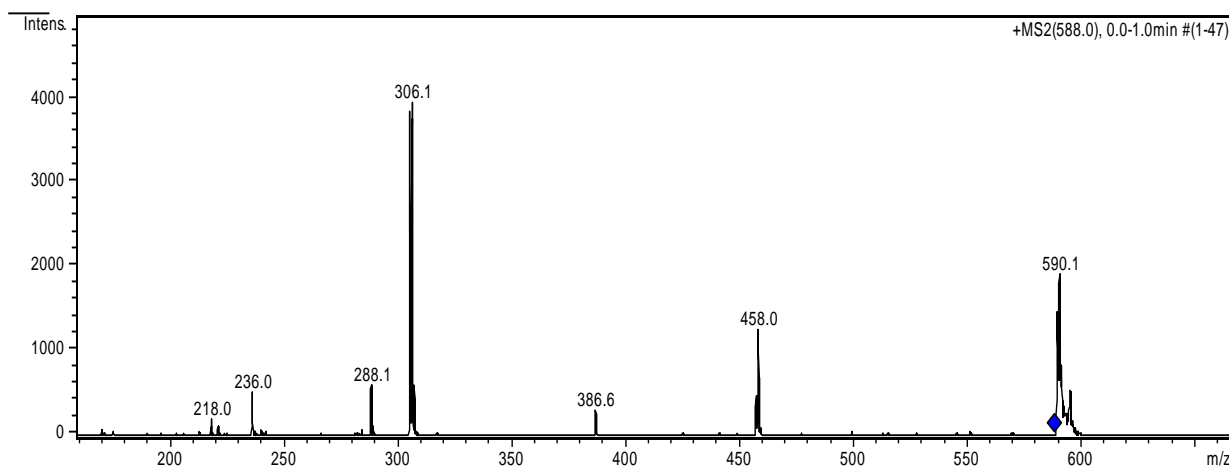
**Obr. 17:** MS elektrolyzátu JTE 907 po oxidácii pri 1,3 V, ESI+



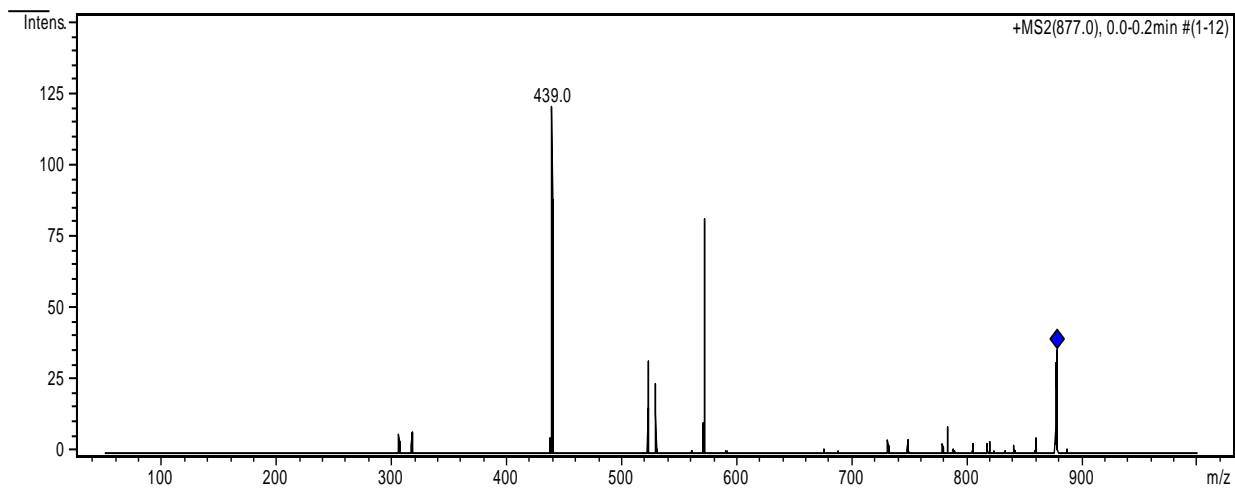
**Obr. 18:** MS elektrolyzátu JTE 907 po oxidácii pri 1,3 V, s prídavkom N-acetylcysteínu, ESI+



**Obr. 19:** MS elektrolyzátu JTE 907 po oxidácii pri 1,3 mV, s prídavkom N-acetylcysteínu, ESI-



**Obr. 20:** MS elektrolyzátu JTE 907: MS/MS iónu  $m/z$  588, ESI+



**Obr. 21:** MS elektrolyzátu JTE 907: MS/MS íonu  $m/z$  877, ESI+