

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

Studium elektrochemických přeměn repaglinidu

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:	Jakub Táborský
Studijní program, obor:	N1407, Analytická chemie
Forma studia:	prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Jana Skopalová, PhD.

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

V Olomouci dne.....

.....

Vlastnoruční podpis

Rád bych poděkoval vedoucí své práce RNDr. Janě Skopalové PhD., za nesčetné konzultace, cenné rady a trpělivost při řešení problémů a experimentů. Poděkování patří i моým rodičům a přítelkyni za podporu ve studiu.

Obsah

Souhrn.....	6
Summary.....	7
Teoretická část.....	8
1. Repaglinid.....	8
1.1. Charakterizace a vlastnosti	8
1.2. Mechanismus účinku	9
1.3. Metabolická přeměna.....	11
1.4. Fyzikálně – chemické vlastnosti	13
1.4.1. Protolytické rovnováhy	13
1.4.2. Rozpustnost	15
1.5. Stanovení repaglinidu	16
1.5.1. Stanovení REP v lékové formě.....	16
1.5.2. Stanovení REP v krevní plasmě	17
2. Biotransformace.....	18
2.1. Biotransformace in vivo.....	21
2.2. Biotransformace in vitro	21
3. Metody studia biotransformace	22
3.1. Analýza metabolitů	22
3.2. Elektrochemie ve farmakologii.....	23
3.2.1. Voltametrie	24
3.3. Instrumentální simulace metabolismu	27
3.3.1. Elektrochemické cely	27
3.3.2. Optimalizace elektrochemické oxidace	28
3.3.3. Membrane Introduction Mass Spectrometry	29
3.3.4. Diferenciální elektrochemická hmotnostní spektrometrie.....	29
3.4. EC/HPLC/MS	33
3.4.1. Srovnání s mikrozomálními metodami	35
Experimentální část	39
4.1. Chemikálie	39
4.2. Příprava roztoků.....	39
4.3. Přístrojové vybavení	39
4.4. Pracovní postupy.....	40
4.4.1. Voltametrické experimenty	40
4.4.2. Elektrolýza.....	40

4.4.3.	HPLC separace s MS detekcí	41
5.	Výsledky a diskuze.....	42
5.1.	Cyklický voltamogram REP	42
5.2.	Závislost na pH	42
5.3.	Opakované cyklické voltamogramy REP	44
5.4.	Závislost na rychlosti skenu.....	45
5.5.	Závislost na koncentraci	49
5.6.	Adsorpce REP na povrch uhlíkové elektrody.....	50
5.7.	Vliv změny přepínacího potenciálu	51
5.8.	Elektrolýza REP s HPLC/MS analýzou oxidačních produktů.....	52
5.8.1.	HPLC/MS analýza REP	52
5.8.2.	MS analýza produktů elektrolýzy.....	57
6.	Závěr.....	62
	Použitá literatura.....	64

Souhrn

Překládaná práce se zabývá elektrochemickou přeměnou léčiva repaglinidu. V teoretické části jsou uvedeny informace o fyzikálně – chemických vlastnostech repaglinidu, způsobu jeho metabolizace a jeho stanovení v lékové formě a krevní plasmě. Dále se práce zabývá možnostmi analýzy biotransformačních produktů a metodami, které slouží k instrumentální simulaci metabolismu, především spojení EC/HPLC/MS.

V praktické části je popsáno elektrochemické chování repaglinidu, které bylo studováno s využitím cyklické voltametrie a diferenčně pulzní voltametrie na elektrodě ze skelného uhlíku. Bylo sledováno chování v závislosti na pH, rychlosti polarizace elektrody a jeho koncentraci. Repaglinid byl poté podroben elektrolýze za konstantního potenciálu na platinové síťkové elektrodě a vzniklé produkty byly analyzovány kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Byly navrženy strukturní vzorce produktů anodické oxidace repaglinidu.

Summary

Presented thesis deals with electrochemical transformation of drug repaglinide. The theoretical part of the thesis gives the informations about physico – chemical properties of repaglinide, way of its metabolism and his determination in pharmaceutical form and human plasma. Further are described possibilities of determination biotransformations products and methods, which are used to instrumental simulation of metabolism, especially EC/HPLC/MS connection.

Experimental part describes electrochemical behaviour of repaglinide, which was studied using cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry at glassy carbon electrode depending on acidity, scan rate and concentration. Repaglinide was then subjected to constant potential electrolysis at platinum gauze electrode. Resulting products was analyzed by liquid chromatography/mass spectrometry. Structural formulas of repaglinide oxidations products have been proposed.

Teoretická část

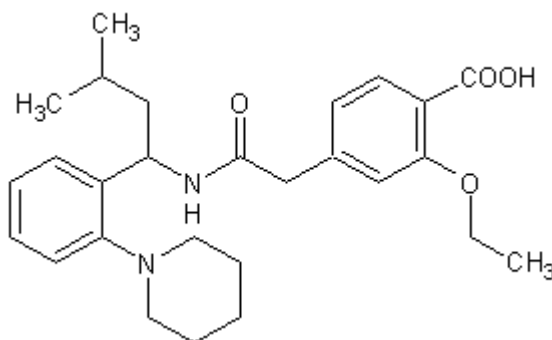
1. Repaglinid

1.1. Charakterizace a vlastnosti

Repaglinid je léčivo, které snižuje obsah glukosy v krvi. Je to derivát kyseliny karbamoylmethylbenzoové. Systematický název je 2-ethoxy-4-[2-(3-methyl-1-[2-(piperidin-1yl)fenyl]butylamino)-2-oxoethyl]benzoová kyselina. Strukturální vzorec je na obrázku 1.

Molekulová hmotnost: 452.6 g/mol

Sumární vzorec: $C_{27}H_{36}N_2O_4$



Obr. 1. Struktura repaglinidu

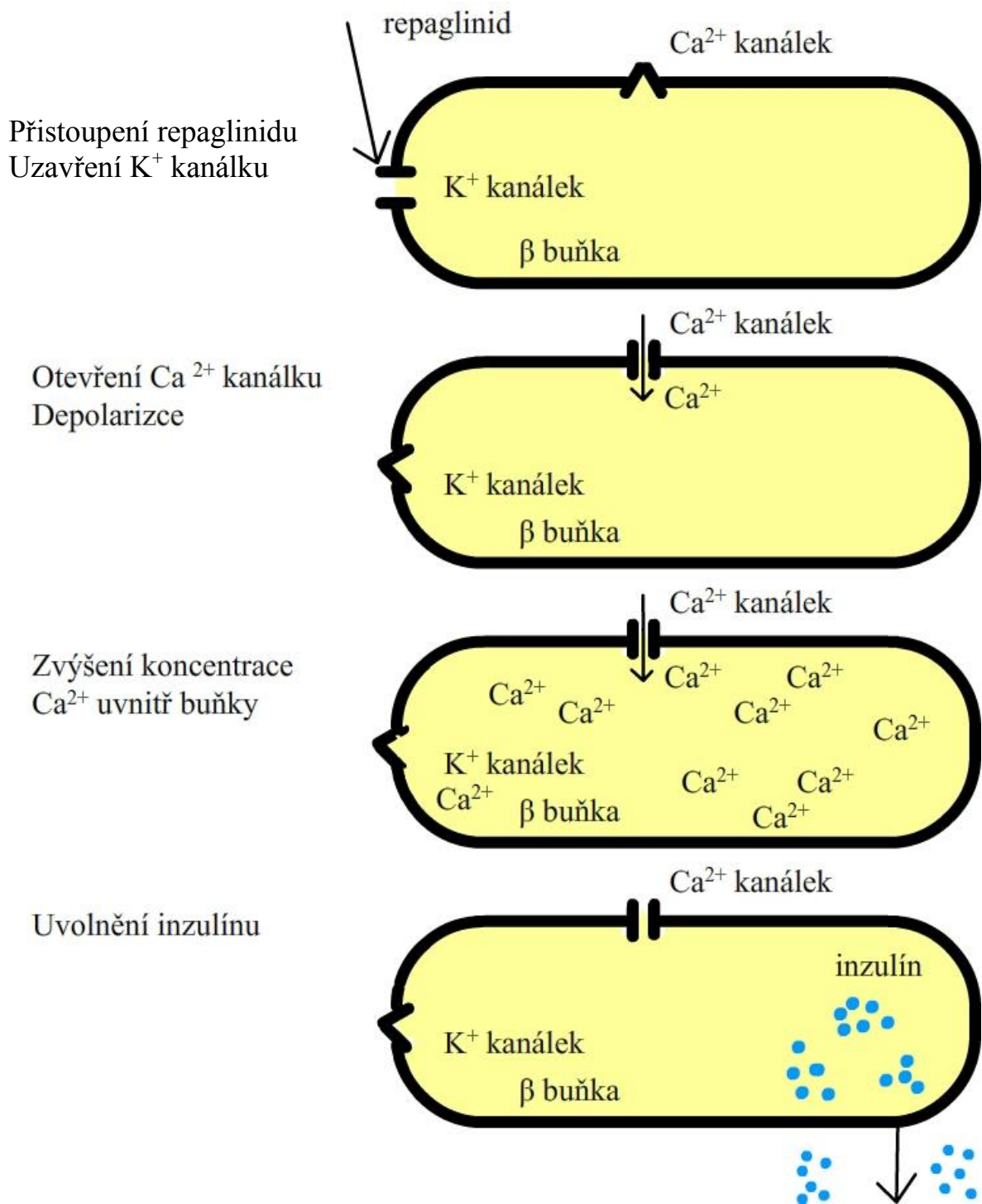
Jedná se bílý až bezbarvý prášek, který je dodáván v tabletách, které obsahují kromě repaglinidu také hydrogenfosforečnan vápenatý, mikrokrytalickou celulózu, kukuřičný škrob, glycerol a další. Konkrétně v tabletách PRADIN se obsah repaglinidu pohybuje v hodnotách 0,5 mg, 1 mg nebo 2 mg. Jako barvicí pigmenty se přidávají oxidy železa. Je určen k léčbě diabetes mellitus 2. typu nedostatečně kompenzovaného dietou a cvičením. Stimuluje sekreci inzulínu z pankreatických β -buněk uzavíráním ATP citlivých draselných kanálků. U zdravých dobrovolníků je značně vstřebáván játry, kde se mění na farmaceuticky inaktivní deriváty. Je vyvinut za účelem předejít nepříznivým efektům spojeným s užíváním jiných antidiabetik. To zahrnuje hypoglykémii či vedlejší kardiovaskulární efekty a jiné. Repaglinid se váže na jiná místa než používané léky na bázi sulfonylmočoviny. Je tři až pětkrát účinnější než glibenklamid a na rozdíl od něj nestimuluje uvolňování inzulínu při absenci glukosy. Velikost dávek je menší než u ostatních perorálních antidiabetik. Toto léčivo je z krve

eliminováno během asi hodiny. Repaglinid je rychle a kompletně absorbován v trávicím traktu, Uváděná průměrná celková biologická dostupnost je okolo 60%.

Repaglinid je proteinově vázán. Vazba na lidský sérový albumin je větší než 98%, hladina volného léčiva v plasmě je velmi malá a pod kvantifikačním limitem většiny analytických metod. Tudíž, pro vhodnou analýzu je potřebná procedura, která eliminuje proteinovou vazbu. ^{1,2,3,4}

1.2. Mechanismus účinku

Jak již bylo zmíněno, mechanismus účinku repaglinidu spočívá v jeho selektivní vazbě na ATP dependtní draselné kanálky v membráně β buněk pankreatum které uzavírá. Sekrece insulínu je kontrolována membránovým potenciálem β buněk, který závisí na aktivitě ATP citlivých draselných kanálků v plasmatické membráně. Uzavřením těchto kanálků, které je způsobeno interakcí s repaglinidem, vede ke zvýšení poměru ATP/ADP v cytoplasmě. Toto způsobí membránovou depolarizaci, otevřou se napětově řízené vápenaté kanálky a zvýší se koncentrace vápenatých iontů v cytoplasmě. Zvýšená hladina Ca^{2+} iontů uvnitř buňky má za následek aktivaci Ca^{2+} dependentních proteinkináz (enzymy, které katalyzují přenos fosfátové skupiny na aminokyselinové zbytky v proteinech), které spouštějí exocytosu sekrečních granul inzulínu a otevření draselných kanálků. Dochází k repolarizaci. Uvolňování insulínu probíhá tak dlouho, dokud se hodnota potenciálu nedostane do klidového stavu. Na obrázku 2 je uvedeno zjednodušené schéma účinku repaglinidu. ^{5,6}

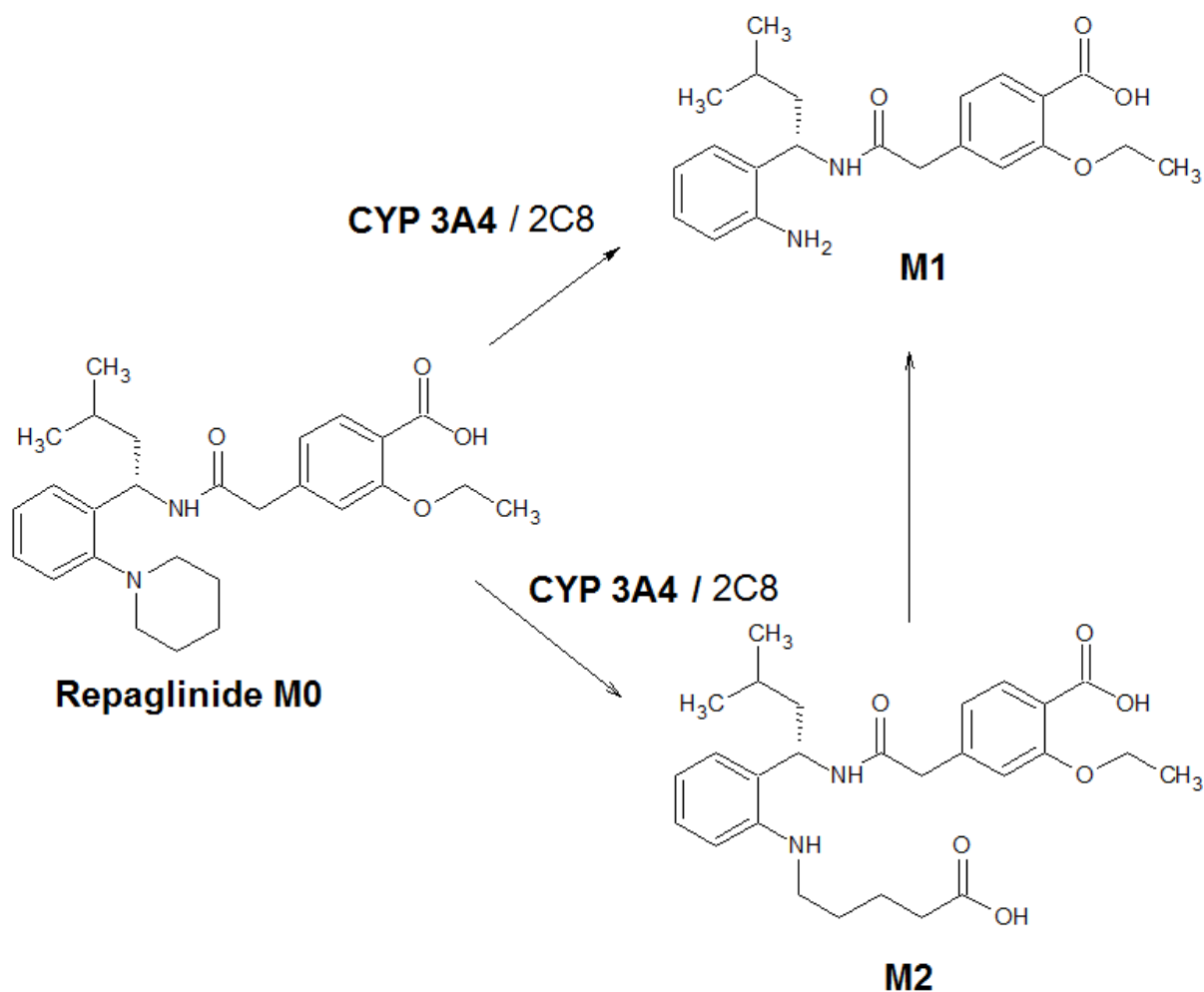


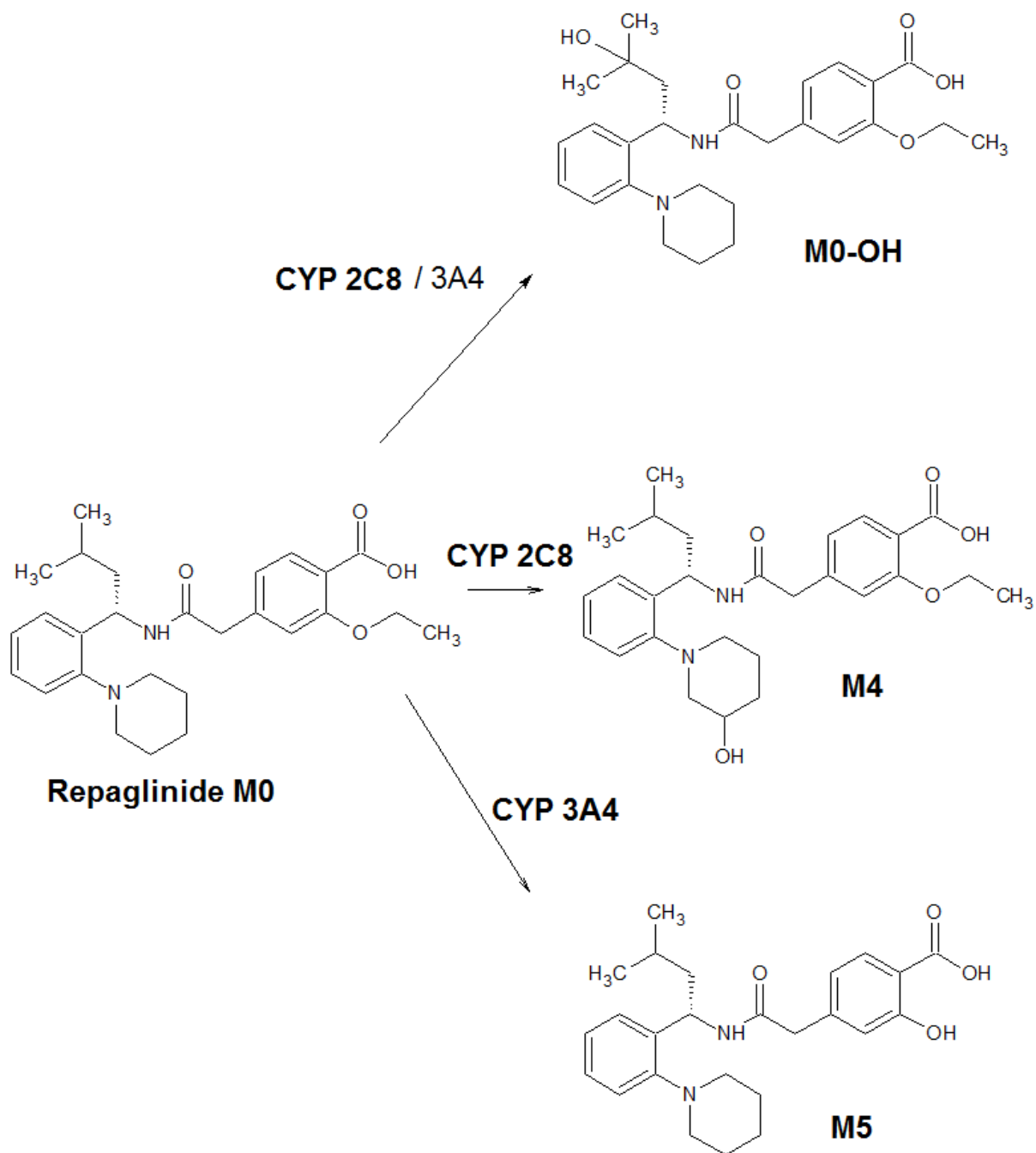
Obr. 2. Zjednodušené schéma účinku repaglinidu⁷

1.3. Metabolická přeměna

Repaglinid se obvykle užívá 15 minut před jídlem. Může být však podán v rozmezí bezprostředně před jídlem až půl hodiny před jídlem.

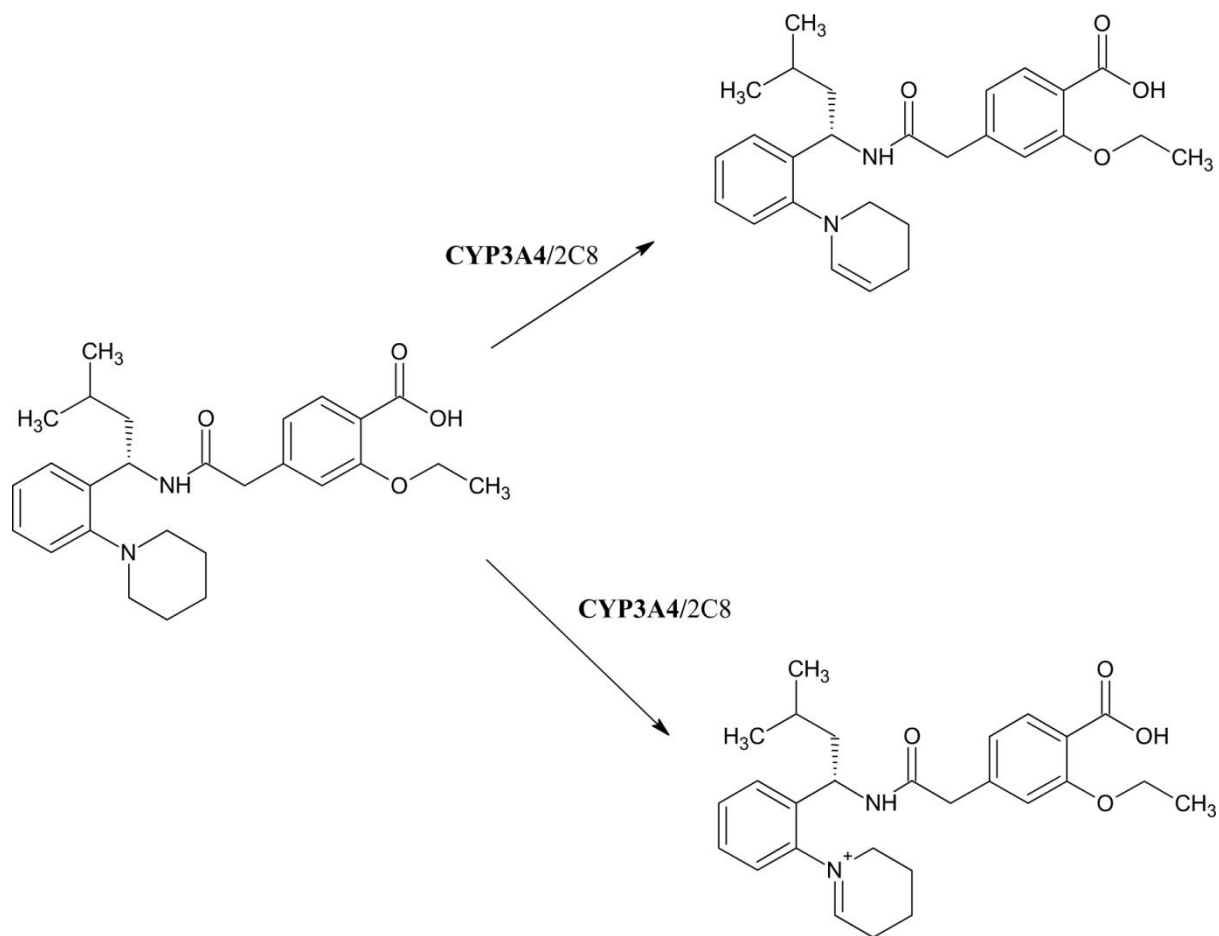
Při studiích *in vitro* bylo zjištěno, že repaglinid je metabolizován oxidativní biotransformací enzymy CYP2C8 a CYP3A4. Z údajů získaných od zdravých dobrovolníků vyplývá, že je podporován spíše metabolismus zprostředkovaný CYP2C8. CYP3A4 má větší přínos je-li CYP2C8 inhibován. Proto je nutné věnovat pozornost přípravkům, které tyto enzymy nějak ovlivňují, protože může docházet ke změně metabolismu repaglinidu. Metabolické produkty repaglinidu *in vitro* jsou uvedeny na obrázku 3. Další možné metabolické produkty jsou uvedeny na obrázku 4.





Obr. 3. *In vitro* metabolity repaglinidu⁸

Repaglinid může být metabolizován přeměnou na aromatický amin (M1), otevřením piperidinového kruhu za vzniku dikarboxylové kyseliny (M2), hydroxylací isobutylového řetězce (M0-OH) nebo piperidinového kruhu (M4), deethylací (M5).⁹



Obr. 4. Navržené biotransformační cesty repaglinidu¹⁰

1.4. Fyzikálně – chemické vlastnosti

Pro lepší porozumění *in vivo* chování repaglinidu, je třeba znát jeho základní fyzikálně-chemické vlastnosti. Protolytické rovnováhy mohou ovlivnit rozpustnost a biologickou aktivitu. Lipofilita a rozpustnost jsou důležité, při absorpci léčiva z trávicího ústrojí a pasivní difúzi přes fosfolipidovou dvojvrstvu membrán buněk.

1.4.1. Protolytické rovnováhy

Repaglinid má jednu slabě zásaditou a jednu slabě kyselou skupinu, a proto se chová ve vodném prostředí jako amfolyt. Přítomnost dvou disociovatelných skupin dává možnost vzniku čtyř protolytických forem ve vzájemné rovnováze.

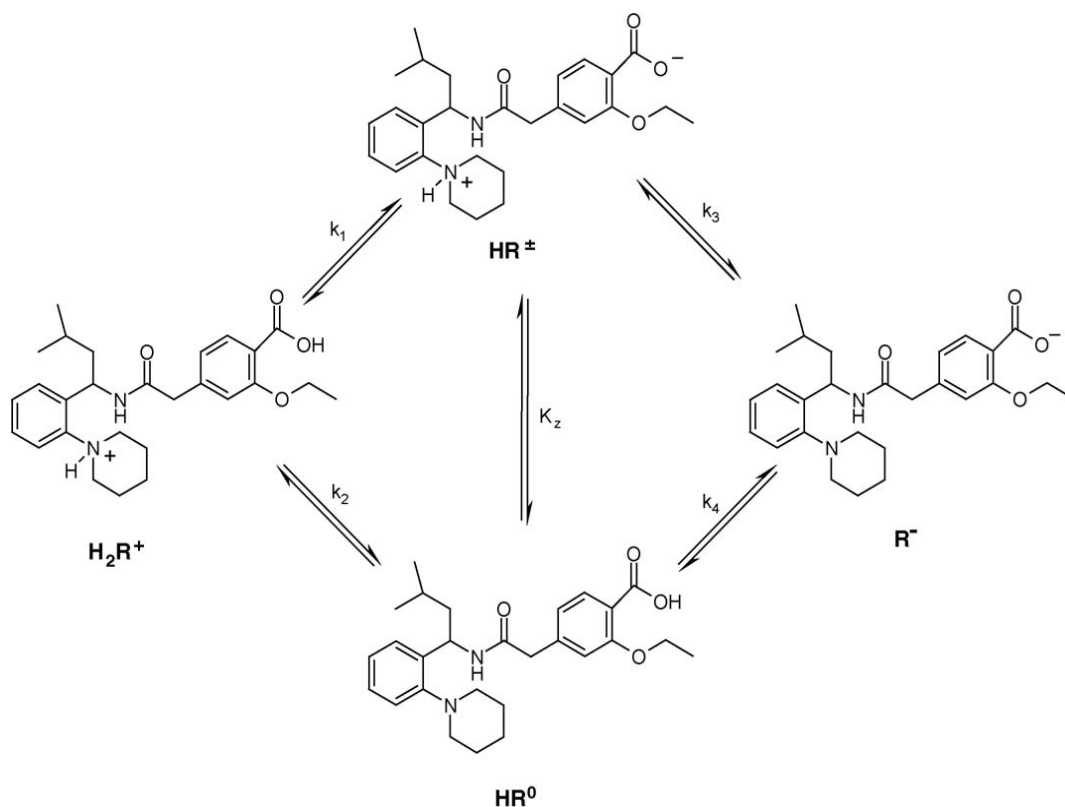
Na obrázku jsou znázorněny čtyři možné struktury repaglinidu v závislosti na pH.

Tautomerní rovnováha K_z může být vyjádřena jako

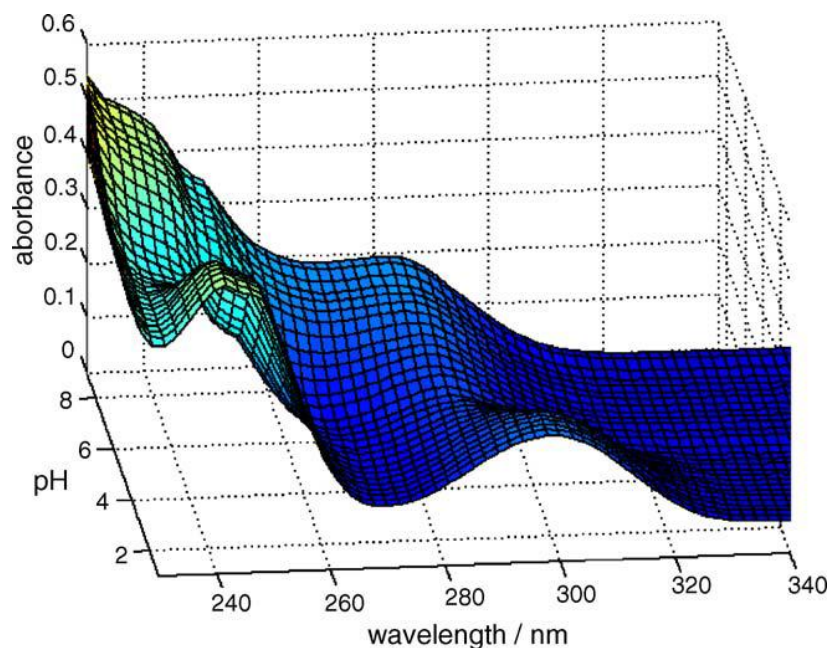
$$K_z = \frac{k_1}{k_2} = \frac{k_4}{k_3} = \frac{C_{HR^\pm}}{C_{HR^0}} \quad (1)$$

Hodnoty k_1, k_2, k_3, k_4 jsou dílčí rovnovážné konstanty mezi jednotlivými protolytickými formami.

Hodnoty pK_{a1} a pK_{a2} můžou být stanoveny potenciometricky nebo spektrofotometricky. Hodnota pK_1 je 3,96 – 4,16 a pK_2 je 6,01 – 6,20.(cit.²) Nižší hodnota pK_a souvisí s protonizací dusíku v piperidinovém kruhu.¹¹ Na obrázku 5 je uvedeno schéma protolytických struktur repaglinidu. Na obrázku 6 je poté spektrum repaglinidu v závislosti na pH. (cit.²)



Obr. 5. Schéma protolytických rovnovah repaglinidu²



Obr. 6. Absorpční spektrum repaglinidu při různém pH (cit.²)

1.4.2. Rozpustnost

Pro sloučeniny se dvěma disociovatelnými skupinami je rozpustnost při jakémkoli pH dána sumou koncentrace každé formy v nasyceném roztoku.

Rozpustnost může být vyjádřena:

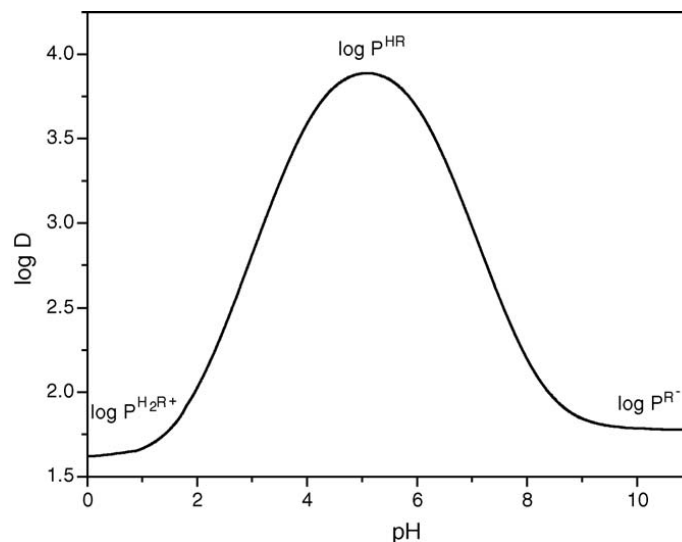
$$S = [H_2R^+] + [HR^0] + [HR^\pm] + [R^-] \quad (2)$$

Z této rovnice plyne, že rozpustnost závisí na disociačních konstantách, pH a na vnitřní rozpustnosti S_0 , které je definována jako rozpustnost neutrální formy. Rozpustnost můžeme tedy vyjádřit:

$$S = S_0(1 + 10^{pKa1 - pH} + 10^{pH - pKa2}) \quad (3)$$

Ve vodném prostředí převažuje forma HR^\pm , tedy forma z deprotonizovanou karboxylovou skupinou a současně protonizovaným dusíkem piperidinu.

Lipofilní profil repaglinidu je znázorněn na obrázku 7 (cit.²). Hodnoty rozdělovacích koeficientů ($\log D$) v systému oktanol/voda jsou největší u nenabitě formy HR_0 repaglinidu.



Obr. 7. Lipofilní profil repaglinidu²

1.5. Stanovení repaglinidu

Bylo již aplikováno několik metod ke stanovení repaglinidu v lidských biologických vzorcích zahrnujících enzymatickou imunologii na pevné fázi, HPLC s elektrochemickou nebo UV detekcí. Používá se rovněž detektor diodového pole a LC-MS/MS. Problémem u stanovení repaglinidu v biologických vzorcích je složitá matrice.^{11,12} Repaglinid je potřeba stanovovat i ve farmaceutických přípravcích, tedy kontrolovat jeho množství v lékových formách.

1.5.1. Stanovení REP v lékové formě

Ke stanovení REP ve farmaceutických substancích se používají metody HPLC s UV detektorem, LC/MS/MS a chirální HPLC s normální fází. Kromě UV detektoru se používá i flourometrický detektor. Stanovení REP v tabletách se může také uskutečnit čistě spektrofotometrickou metodou. Při analýze lékové formy REP se určitý počet tablet zváží a zjistí se jejich průměrná hmotnost. Poté jsou tablety rozemlety na prášek. Vzorek se připravuje rozpuštěním takového množství REP aby vznikl roztok určité koncentrace. Jako rozpouštědlo se používá metanol, ACN, nebo směs metanolu a pufru. Před chromatografickou separací se roztok vzorku filtruje a ředí mobilní fází. Literatura uvádí směsi metanol/triethylamin nebo acetonitril/octan amonný.^{13,14,15}

Stanovení REP spektrofotometrickou metodou využívá reakci přenosu elektronu mezi REP a vhodným reaktantem. K této reakci se používají roztoky 2,5-dichlor-3,6-dihydroxybenzochinonu (CAA) nebo 2,3-dichlor-5,6-dikyano-1,4-benzochinonu (DDQ) v dioxanu. REP působí jako n-donor a CAA a DDQ jako π -akceptory. Před měřením se smíchá analyzovaný roztok REP s reakčním roztokem činidla a měří se absorbance proti blanku. CAA se měří při 520 nm a DDQ při 590 nm. Meze detekce (LOD) této metody jsou 7,07 $\mu\text{g/ml}$ u CAA a 2,42 $\mu\text{g/ml}$ u DDQ, meze stanovitelnosti (LOQ) 21,43 $\mu\text{g/ml}$ pro CAA a 7,33 $\mu\text{g/ml}$ pro DDQ. Molární absorpční koeficient $1,02 \cdot 10^3 \text{ L/mol.cm}$ CAA, $4,60 \cdot 10^3$ DDQ. Rozsah linearit je 20 – 400 $\mu\text{g/ml}$ CAA, 5 – 80 $\mu\text{g/ml}$ DDQ.¹³ Další způsob spektrometrického stanovení REP ve farmaceutické substanci využívá oxidace REP chloridem železitým a následnou tvorbou komplexu s 2,2-bipyridylem. Vzniklé červené zbarvení se měří při 530 nm.¹⁶

Při analýze REP metodou HPLC s UV detekcí se používají kolony s náplní C-18. Mobilní fáze se upravují na neutrální až kyselější hodnotu pH. Absorbance v UV spektru je měřena při 240 nm respektive při 235 nm. Při analýze REP v kyselější mobilní fázi (pH 4,5) se dosáhlo hodnot LOD 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a LOQ 0,4 $\mu\text{g/ml}$.^{14,15}

Obsah REP v tabletové formě se dá také analyzovat fluorescenční spektrometrií. Excitační spektrum je měřeno při 282 nm a emisní při 379 nm. Hodnoty LOD a LOQ jsou 5 $\mu\text{g/ml}$ respektive 10 $\mu\text{g/ml}$.¹⁵

Další možností jak stanovit REP je použít elektrochemické metody. El-Ries a spol. použili pastovou uhlíkovou elektrodu (PE) a elektrodu ze skelného uhlíku (GCE) v tříelektrodovém zapojení. Metodou diferenčně pulsní voltametrie dokázali REP stanovit s hodnotami LOD $1,35 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$ a LOQ $4,94 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$ pro PE a LOD $1,06 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$ a LOQ $3,54 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$ pro GCE.¹⁷

1.5.2. Stanovení REP v krevní plasmě

Při stanovení repaglinidu v krvi je třeba ho izolovat z krevní plasmy. V literatuře jsou uváděny tři postupy deproteinace, přímá deproteinace centrifugací pomocí filtru, vysrážení proteinu acetonitrilem nebo extrakcí kapalina – kapalina do ethylacetátu.

Při extrakčních procedurách se postupuje nejčastěji tak, že se plasma po případné úpravě pH přidaným pufrům, smíchá s vhodným srážecím nebo extrakčním činidlem a míchá

se na třepačce.. Směs se poté centrifuguje. Supernatant nebo extrakt se odebere do zkumavky či vialky a je pod dusíkem odpařen. Odparek je poté rozpuštěn v mobilní fázi použité v HPLC.^{4,11,12,17}

Elektroaktivní vlastnosti REP jsou využity při jeho coulometrickém stanovení po HPLC separaci. Dvoukanálový detektor dosáhl při analýze REP v plasmě hodnot LOD 2,8 nmol/l a LOQ 8,5 nmol/l.⁴ Ke stanovení REP v krevní plasmě se použila také diferenčně pulzní voltametrie. Linearita této metody je v rozmezí $1,2 - 3,2 \cdot 10^{-6}$ mol/l v případě použití PE a $8,0 - 40 \cdot 10^{-7}$ mol/l v případě GCE.¹⁷

Ruzilawati a jeho tým analyzovali REP metodou HPLC s detektorem diodového pole. Touto metodou získali hodnoty LOD 10 ng/ml a LOQ 20 ng/ml.¹¹

Zhang a spol. použili k analýze obsahu REP v krevní plasmě metodu HPLC s tandemovým hmotnostním spektrometrem. REP byl izolován extrakcí kapalina – kapalina. K ionizaci použili elektrosprej v kladném módu. Touto metodou dosáhli LOD 0,01 ng/ml.¹²

2. Biotransformace

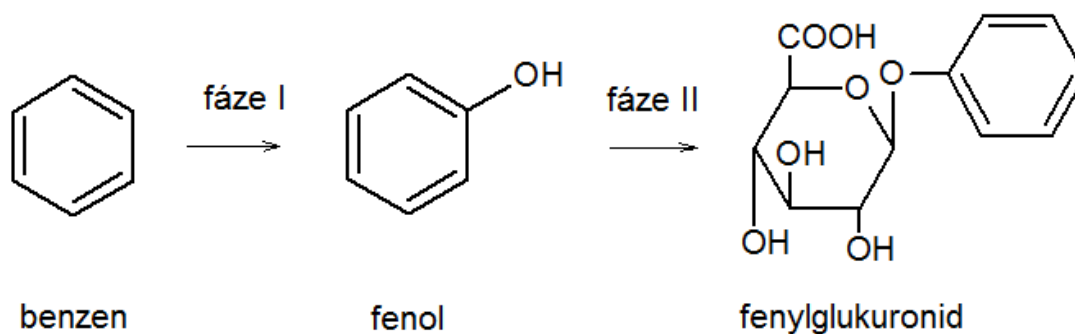
Biotransformace (metabolismus) je souhrn chemických reakcí, kterými jsou endogenní i exogenní látky přeměňovány na metabolity. Biotransformace má za úkol chemicky přeměnit exogenní látky absorbované do těla a vlastní látky tak aby mohly být z organismu vyloučeny. Exogenní látka (např. léčivo) může být metabolicky degradováno, vzniká neaktivní metabolit (biodegradace) nebo aktivováno, vzniká aktivní metabolit (bioaktivace). Příkladem bioaktivace je kodein aktivovaný na morfin. V případě, že původní látka je již účinná pak její bioaktivace vede k prodloužení účinku nebo k tvorbě nositelů toxicity. Metabolity musí být rozpustné ve vodě aby mohlo opustit organismus, neboť exkreční tekutiny (žluč, moč, pot...) používají jako rozpouštědlo vodu. Proto musí být léčiva metabolizována na hydrofilní látky.

Metabolismus léčiva je rozdělen do dvou typů reakčních stupňů označovaných fází I a fází II. Biotransformační cesty mohou být zprostředkovány jednotlivými fázemi nebo jejich kombinací. Příklady reakcí fáze I a jejich substrátů jsou uvedeny v tabulce 1. Dominujícími enzymy ve fázi I jsou enzymy cytochromu P450 (CYP). Ten se nachází hlavně v játrech. Tyto enzymy obsahují ve své struktuře hem a jejich jméno je odvozeno od charakteristické

vlastnosti enzymů absorbovat UV záření při 450 nm, pokud jsou v komplexu s oxidem uhelnatým. Jsou to nesespecifické enzymy. Bylo popsáno mnoho izoform, které jsou roztríděny do rodin na základě shody sekvencí aminokyselin v jejich proteinových řetězcích. Biotransformace se nejvíce účastní rodiny 1 – 4. CYP dokáže zpracovat substráty o různé velikosti od ethylenu ($M_r = 28$) po cyklosporin A ($M_r = 1201$). Enzymy CYP jsou odpovědné za oxidaci. Redukce a hydrolýza jsou na CYP nezávislé. Molekula látky se při transformaci ve fázi I obvykle zmenšuje. Enzymy fáze II, např. N-acetyl transferáza, sulfotransferáza, uridin difosfoglukuronosyl transferáza (UGT) jsou také důležité při biotransformaci či vylučování xenobiotik. Při reakcích fáze II dochází ke konjugaci s kyselinou glukuronovou, sírovou, glutathionem aj. Molekula se zvětšuje. Jednoduchý příklad obou biotransformačních fází ukazuje obrázek 8.

Biotransformace terapeutické látky je jedna z nejdůležitějších informací, která poskytuje celkový terapeutický a toxikologický profil dané látky. K biotransformaci dochází nejčastěji v játrech ale také v ledvinách, kůži, plicích a střevech. Biotransformací léčiva ovlivňují různé faktory jako jsou věk, pohlaví, genetická dispozice, patologické jevy, opakované podávání léku či současné užívání více léků. Při opakovaném užívání léku dojde ke zvýšení syntézy a aktivity enzymu odpovědného za metabolismus léčiva. Tomuto ději se říká enzymová indukce a léčivo se nazývá induktor. Důsledkem tohoto jevu je zvýšená biotransformace, která vede ke snižování intenzity účinku a také vede ke zkrácení doby účinku. Také užíváním více léčiv je možné dosáhnout indukovaní enzymů. Protože se jedná o nesespecifické enzymy, mohou některé induktory ovlivnit biotransformaci jiných léčiv, dochází k heteroindukci.

Vývoj nové terapeutické látky vždy zahrnuje předklinické testy. Během tohoto testování jsou prováděny farmakokinetické, farmakodynamické a toxikologické analýzy. Tyto analýzy jsou prováděny jak *in vivo* („v živém“) tak *in vitro* („ve skle“).^{18,19,20,21}



Obr. 8. Příklad biotransformace aromatického jádra²⁰

Otázka biotransformace u člověka je, jak spolehlivě extrapolovat data z experimentů *in vivo* a *in vitro* do klinické praxe. Bylo tedy nutno sestavit modelový systém, který by predikoval lidskou biotransformaci. Tyto modely jsou používány k získávání informací o metabolických cestách a předpovídají interakci léčivo-léčivo na metabolické úrovni.¹⁸

Tab. 1. Reakce Fáze I a jejich substráty²⁰

REAKCE I. FÁZE	TYPICKÉ SUBSTRÁTY
Oxidace dependentní na CYP450	
Hydroxylace	Barbituráty, amfetaminy, fenytoin
N-dealkylace	Morfin, kofein, teofylin
O-dealkylace	kodein
N-oxidace	Acetaminofen, nikotin
S-oxidace	Tioridazin, cimetidin, chlorpromazin
Deaminace	diazepam
Oxidace ne dependentní na CYP450	
Oxidace aminů	adrenalin
Dehydrogenace	etanol
Redukce	Chloramfenikol, naloxon, dantrolen
<i>Hydrolyzá:</i>	
hydrolýza esterů	Prokain, acylpyrin, klofibrát
hydrolýza amidů	Prokainamid, lidokain, indometacin

2.1. Biotransformace in vivo

Během 20. století došlo k výraznému pokroku v porozumění a léčbě nemocí, v objevování a vývoji nových léčiv. Ve všech medicínských úspěších, vývoj antibiotik a vakcín, léků k léčbě cukrovky či astmatu apod. hrály důležitou roli testy *in vivo*.²²

Při zkoumání metabolismu terapeutické látky *in vivo* je látka aplikována na živý organismus (zvíře, člověk). Produkty biotransformace jsou detekovány v krvi nebo moči, u zvířat se někdy produkty biologické přeměny zkoumají přímo v orgánech, kde k nim dochází.^{23,24,25} Postup analýzy metabolitů je nutno přizpůsobit tomu, v jaké tkáni analýzu provádíme. Pokud analyzujeme produkt metabolismu přímo ve vnitřním orgánu, je často nutné provést eutanazii zvířete. Před analýzou je nutné metabolit separovat od matrice. To se může provést extrakcí na tuhé fázi či extrakcí kapalina – kapalina. Separace je spojena s centrifugací. K nejběžnějším instrumentálním metodám patří spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem nebo UV/VIS detekcí, použití nachází i fluorescenční a elektrochemický detektor, v některých případech se používá i plynová chromatografie. Další možností detekce metabolitů je kapilární elektroforéza. V případě použití biochemických metod je nutné vzorek rovněž upravit. Analyzujeme-li vnitřní tkáň (ledviny, játra) provádí se jejich homogenizace a následně centrifugace. Z enzymatických metod se používá ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) a jiné metody imunoanalýzy. Při těchto metodách se měří aktivita enzymu respektive jeho inhibice. Detekce produktu imunoanalýzy se může provádět fluorimetricky, turbidimetricky, nefelometricky, imunoelektroforézou, spektrometricky a také elektrochemicky.^{24,26,27,28,29,30,31,32}

2.2. Biotransformace in vitro

In vitro metody se široce využívají ke studiu fyziologické, biologické a farmakologické aktivity na úrovni buněk a tkání.

Výsledky z *in vitro* testů mají hlavně kvalitativní informaci, např. pokud *in vitro* analýza neprokáže interakci léčivo-léčivo, nemusí být proveden *in vivo* test, v případě interakce je nutno test provést. *In vitro* systémy jsou používány zejména pro screeningové účely a pro tvorbu komplexnější toxikologie.¹⁸ Primární metabolické cesty *in vivo* mohou být zjištěny použitím *in vitro* inkubace s vhodnými subbuněčnými frakcemi a kofaktory.

Buňky savců jsou obecně pěstovány při definovaných podmínkách v inkubátoru. Teplota je udržována obvykle na 37 °C a složení atmosféry je 5% CO₂ a 95% O₂. Důležitá je volba vhodného složení kultury, ve které chceme buňky pěstovat.³³

Pro lidskou biotransformaci se používá řada *in vitro* metod, např.: mikrozomální metoda, metoda cytosolu, metoda buněčných linií, metoda jaterních plátků či prokrvení jater.

Mikrozomální metoda (Human liver microsomes – HLM) je nejpopulárnější *in vitro* model, který poskytuje cenově dostupnou cestu k dobré indikaci metabolického profilu CYP. Mikrozomy se získávají biopsií z pacientových jater po jeho souhlasu. Vzorek jater se homogenizuje a centrifuguje. Supernatant se centrifuguje ještě jednou. Pelety (frakce mikrozomů) se rozpustí v pufru a jsou skladovány při velmi nízkých teplotách. Koncentrace protein v mikrozomech se obvykle určuje metodou Lowryho nebo Bradforda. Inkubace se substrátem se provádí v inkubačním roztoku, který zpravidla obsahuje pufr o pH 7,4 a určité iontové prostředí. Po reakci se inkubační roztok centrifuguje a supernatant se používá ke stanovení produktu enzymatické reakce metodami HPLC/UV nebo HPLC/MS. Produkty se analyzují také imunochemickými metodami. Výhodou této metody je nízká cena a jednoduchost, nevýhodou je, že výsledky nemohou být použity pro kvantitativní odhady *in vivo* biotransformace u člověka, protože CYP jsou obohaceny o mikrozomální frakci a nejsou v kompetici s jinými enzymy.^{18,34,35,36,37}

3. Metody studia biotransformace

3.1. Analýza metabolitů

Analytické techniky používané pro analýzu endogenních metabolitů (metabolomika, metabonomika) musí být schopné přesné a selektivní analýzy známých i neznámých molekul s rozdílnými chemickými vlastnostmi a v širokém rozsahu koncentrací.

Metabolom je kvalitativní a kvantitativní soubor všech nízkomolekulárních látek (metabolitů), které jsou přítomné v buňce, účastní se hlavních metabolických reakcí a jsou nezbytné pro udržování aktivity, růst a normální fungování buňky. Metabolity jsou jedinečná a charakteristická chemická individua. Metabolity z jedné metabolické cesty se mohou od sebe významně lišit svými chemickými či fyzikálními vlastnostmi. Metabolom se tedy může

skládat ze sloučenin od anorganických iontů přes těkavé alkoholy až po hydrofilní sacharidy, aminokyseliny či hydrofobní lipidy.³⁸

Pro analýzu metabolitů se využívá několika analytických metod, k nimž patří plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS), kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií, kapalinová chromatografie s elektrochemickým detektorem (LC-EC) nebo nukleární magnetická rezonance (NMR).

NMR a MS nám poskytují kvalitativní charakteristiky nezbytné pro identifikaci látek, určení jejich struktury a čistoty.

Data získaná z MS experimentů z fragmentace jednotlivých metabolitů a z měření přesné hmoty s vysokým rozlišením jsou největší výhodou metody LC-MS. Avšak volba MS metody (technika ionizace, hmotnostní analyzátor...) je velmi závislá na analytickém úkolu.

LC-EC je používáno pro multisložkové profilování endogenních metabolitů s možností analyzovat mnoho metabolitů během jedné analýzy. Limity detekce se pohybují ve fmoL a dynamický rozsah je větší než čtyři řády. Metoda LC/EC se používá při analýzách redoxně aktivních sloučenin, jako jsou hormony, anti-oxidanty, neurotransmitery. Používá se tedy při studiu oxidačních metabolitů a redoxních biologických procesů. Tato metoda se dá použít jen pro oxidovatelné nebo redukovatelné látky a neposkytuje dostatečná data o struktuře.

Z výše uvedeného tedy plyne, že žádná technika sama o sobě nedostačuje pro kompletní analýzu. Mnoho metabolomických výzkumů se provádí několika komplementárními metodami.³⁹

3.2. Elektrochemie ve farmakologii

Do dnešní doby běžně užívané techniky pro analýzu léčiv ve farmaceutických substancích a biologických vzorcích (HPLC, LC/MS, spektrometrie a mikrobiologický přístup) potřebují zahrnout krok derivatizace nebo časově náročnou extrakční proceduru pro analýzu běžných velmi malých koncentrací léčiv. Jelikož tyto metody mají drahou instrumentaci jako i provozní náklady, elektrochemické metody mohou být zajímavou alternativou, pro svou jednoduchost, rychlost, menší pořizovací náklady a vysokou citlivost.

Elektrochemické metody jsou užitečným nástrojem nejen pro vyšetření reakcí přenosu elektronu ale mohou také poskytnout hodnotné informace, které pomáhají porozumět

biologickým procesům. Elektrochemie je často využívána jako simulační technika v metabolismu léčiv, neboť většina reakcí první fáze metabolismu jsou oxidační reakce.^{40,41}

Elektrochemické měření redukce a oxidace organických sloučenin umožňuje lépe porozumět jak jsou tyto látky metabolizovány v těle živých organismů. Mechanismus těchto reakcí je rovněž důležitý. Tyto elektrochemické metody pro analýzu procesů na rozhraní elektroda/roztok umožnily rozdělit mnoho procesů do několika postupných kroků. Elektrooxidace či redukce dovoluje zastavit proces v určité fázi, např. při adici nebo eliminaci funkční skupiny, formování heterocyklů apod. a analyzovat meziprodukty reakce.⁴²

Dále jsou elektroanalytické metody použitelné pro analýzu v různých biologických matricích. Analyt může být identifikován na základě hodnoty půlvlnového potenciálu.⁴⁰

3.2.1. Voltametrie

Jak již bylo zmíněno dříve, voltametrie vyniká svou jednoduchostí, časovou nenáročností, citlivostí a selektivitou a hlavně nízkou cenou. Použití různých elektrod (rtuť, tuhé elektrody, modifikované elektrody) zvyšuje použitelnost při analýze aktivních sloučenin, které podléhají redoxním reakcím.⁴⁰

Protože se biologické redoxní reakce odehrávají v lipidové dvojvrstvě, je vhodné používat nevodná prostředí pro modelové studie.⁴¹

3.2.1.1. Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie (CV) je často první použitou metodou při elektrochemickém studiu sloučeniny, biologického materiálu nebo elektrodového povrchu. Výhodou CV je její schopnost rychlého pozorování redoxního chování přes široký potenciálový rozsah. CV je jednou z nejpoužívanějších elektrochemických metod ve farmaceutické analýze. CV byla použita k analýze stability a vzniku radikálového aniontu z PA-824 (antituberkulózní léčivo), ke studiu kinetiky hydrolytického rozkladu droxikamu a k předpovědi jeho možného farmakologického účinku v organismu, analyzoval se acetaminofen v paracetamolových tabletách. Tabulka 2 uvádí některé studované farmaceutické sloučeniny.⁴⁰

Tab. 2 Přehled vybraných léčiv a metod jejich stanovení

Substance	Pracovní elektroda	detekční limit	Metoda	Reference
acetaminofen	MGC	$1,7 \cdot 10^{-7}$ mol/l	CV	43
diazepam	DME, HMDE	$9,6 \cdot 10^{-9}$ mol/l	CV	44
	CP	0,021 μ g/ml	DPV	45
dopamine	GC	$0,08 \cdot 10^{-6}$ mol/l	SWV	46
epinefrin	MGE	$6 \cdot 10^{-8}$ mol/l	CV	47
lidokain	BDD	10 μ g/l	SWV	48
para-amino benzoová kyselina	MCP	0,1 μ g/ml	DPV	49
repaglinid	CP	$1,34 \cdot 10^{-7}$ mol/l	DPV	17
fenbendazol	GC	$5,2 \cdot 10^{-5}$ a	CV, DPV	50
		$5,0 \cdot 10^{-6}$ mol/l		
serotonin	GC	-	SWV	51
tryptofan	MCP	$1,0 \cdot 10^{-7}$ mol/l	DPV	52
Valacyklovir	GC	$1,04 \cdot 10^{-7}$ mol/l	DPV	53

GC – skelný uhlík; MGC – modifikovaný GC; DME – kapající rtuťová elektroda; HMDE – visící kapková rtuťová elektroda; CPE – uhlíková pastová elektroda; BDD – borem dopovaná diamantová elektroda; MCPE – modifikovaná uhlíková pastová elektroda⁴⁰

3.2.1.2. Pulsní a square wave voltametrie

Pulsní techniky byly vyvinuty za účelem zvýšení citlivosti a snížení detekčního limitu. Diferenční pulsní voltametrie (DPV) je extrémně účinná pro analýzu stopového množství elektroaktivních sloučenin ve farmaceutických a biologických vzorcích.

Square wave voltametrie (SWV) byla použita například k analýze viagry a jejího metabolitu v moči na základě jejich redučního chování na visící rtuťové elektrodě.

Hlavní výhodou SWV je její rychlost. Kompletní voltamogram může být zaznamenán během několika sekund v porovnání s DPV, kde záznam trvá 2 – 3 minuty. Při použití rtuťové elektrody může být záznam pořízen na jedné kapce. Také je v některých případech citlivější než DPV.⁵⁴

3.2.1.3. Anodická rozpouštěcí voltametrie

Anodická rozpouštěcí voltametrie (ASV) je nejrozšířenější forma rozpouštěcí analýzy. V této technice se využívá prekoncentrace předběžnou elektrolýzou. K analýze organických sloučenin se používají modifikované elektrody. K modifikaci se používá polymerní film s nabitou skupinou, která umožňuje selektivní prekoncentraci kationtů elektrostatickou interakcí. Hydrofobní síť polymeru umožňuje selektivitu pro hydrofobní organické kationty díky hydrofobní interakci.^{55,56}

3.2.1.4. Katodická rozpouštěcí voltametrie

Metoda má množství aplikací v organické a medicíně. Jde o zrcadlový opak ASV. Při katodické rozpouštěcí voltametii (CSV) se nejprve analyt při prekoncentraci oxiduje a následně redukuje. I v této technice se používají modifikované elektrody. Například pro analýzu kreatinu se připravil polymerní film molekulárním “vtištěním” molekuly kreatinu do polymerního řetězce. Tento polymer má potom vysokou citlivost a selektivitu právě pro kreatin.⁵⁷

3.2.1.5. Adsorpční rozpouštěcí voltametrie

Důležitou vlastností adsorpční rozpouštěcí voltametrie (AdSV) je vyšší citlivost a lepší selektivita v porovnání s ostatními voltametričnými metodami. Zahrnuje jednoduché rozpouštění biologických vzorků ve vhodných rozpouštědlech redukuje nutnost zdlouhavých extrakčních procedur používaných v chromatografii a spektrometrii jako je extrakce kapalina – kapalina a extrakce na tuhých fázích. Citlivost je značně zvýšená adsorpcí léčiva na elektrodě a po pečlivém zvolení parametrů metody může být dosaženo extrémně nízkých detekčních limitů. Tato technika má výhody v nízkém detekčním limitu, vysoké citlivosti, širokém spektru testovaných látek, relativní jednoduchosti a nízké ceně vybavení.⁵⁰

3.3. Instrumentální simulace metabolismu

Objasnění metabolické cesty potenciálních léčiv v lidském těle je jeden z hlavních úkolů farmaceutického výzkumu. S rychle rostoucím počtem nových chemických látek během posledních let je potřeba rychlých screeningových metod, které poskytnou jak spolehlivé tak jednoduše dostupné informace o biotransformaci léčebného kandidáta. Čím dříve jsou tyto testy provedeny, tím dříve mohou být vyloučeny nevhodné lékové prerekvizity z vývojového procesu. To je důležité hlavně z ekonomického hlediska v počátečním vývoji léčiva.⁵¹

Před zhruba 20 lety byl zahájen vývoj čistě instrumentální metody pro simulaci reakcí oxidace metabolitů. V posledním desetiletí se tento systém značně rozšířil, k tomu vedla zvýšená komerční dostupnost jednotlivých instrumentů a také skutečnost, že ionizace elektrosprejem se stala běžnou ionizační technikou při spojení s elektroanalytickými systémy. Systém sestává z elektrochemické cely spojené s hmotnostním spektrometrem (EC/MS). Elektrochemie umožňuje simulovat oxidační produkty metabolické fáze I podobně jako mikrozomální metody. Přestože enzymatický mechanismus je rozdílný od elektrochemického, bylo dokázáno, že elektrochemické reakce jsou částečně podobné jako enzymatické. Možnost přímo detekovat a identifikovat metabolity a jejich intermediáty je velkou výhodou oproti klasickým *in vitro* a *in vivo* metodám.^{52,53,54,55}

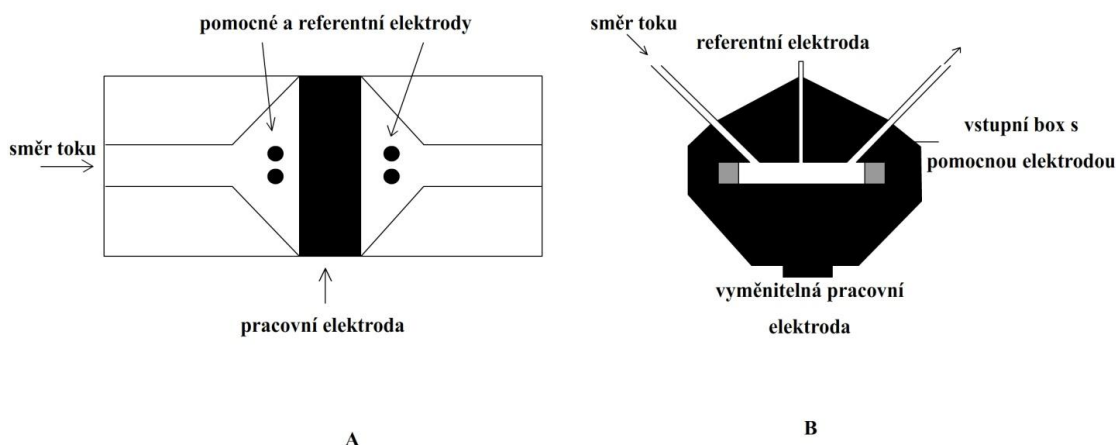
3.3.1. Elektrochemické cely

Většina studií zaměřených na elektrochemickou simulaci oxidativního metabolismu byla provedena na komerčně dostupných coulometrických průtokových celách. Mimo ně byly použity v několika aplikacích amperometrické tenkovrstevné a “wall-jet” cely. Všechny typy cel jsou vybaveny třemi elektrodami, pracovní, referentní a pomocnou.

Pracovní elektroda coulometrických průtokových cel je porézní, nejčastěji ze skelného uhlíku. Analyt prochází přes elektrodu a je oxidován na velkém povrchu. Hlavní výhodou tohoto uspořádání je vysoký stupeň konverze analytu při průtocích od 10 do 500 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Amperometrické cely mají planární pracovní elektrodu. Její povrch je méně náchylný k adsorpčním procesům než coulometrická elektroda. V porovnání s průtokovou elektrodou je třeba použít menší průtoky, okolo 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, tudíž tento systém nemůže být umístěn do vysokotlaké části HPLC systému a používá se hlavně při off-line experimentech. Tato

nevýhoda může být překonána umístěním přepínacího ventilu. Tenkovrstevná cela poskytuje možnost začlenění pracovních elektrod z různých materiálů, například pracovní elektrody z platiny vykazují nižší adsorpční vlastnosti než elektrody ze skelného uhlíku, borem dopované diamantové elektrody jsou vysoce odolné proti chemikáliím a poskytují široké potenciálové oxidační okno. Na obrázku 9 jsou znázorněna schémata nejpoužívanějších cel.⁵¹



Obr. 9 Schéma nejpoužívanějších cel A – coulometrická cela, B – amperometrická cela⁵¹

3.3.2. Optimalizace elektrochemické oxidace

Elektrochemická oxidace musí být pečlivě optimalizována pro každou aplikaci zvlášť. Je třeba vhodně zvolit typ elektrochemické cely, oxidační potenciál, pufr a při průtokových měřeních rychlost průtoku.

Nepolární sloučeniny mají tendenci se adsorbovat na povrchu porézní elektrody skelného uhlíku v coulometrických systémech, proto se častěji používají amperometrické cely, kde můžeme měnit materiál pracovní elektrody. Roztok pufru slouží jako základní elektrolyt ale také udává hodnotu pH, která se nejčastěji nastavuje na hodnotu fyziologického pH 7,4. Hodnota průtoku ovlivňuje stupeň konverze. Čím nižší je průtok, tím vyšší stupeň konverze. Avšak při příliš malých průtocích se zvyšuje adsorpce na povrchu elektrody.

Nejllepší způsob optimalizace oxidačního potenciálu je pořízení “hmotnostního voltamogramu”. Výstup z EC cely je přímo napojen na ionizační zdroj hmotnostního spektrometru. Sloučenina kontinuálně protéká EC celou a potenciál pracovní elektrody je měněn v požadovaném rozmezí. Hmotnostní spectra jsou poté sestavena pro různé potenciály

do třídimezníálních grafů a z nich je poté možné získat informace o vhodném oxidačním potenciálu.⁵¹

3.3.3. Membrane Introduction Mass Spectrometry

Mezi nejdůležitější studie patří ty, které se zabývají studiem přímého spojení klasické elektrochemické cely s hmotnostním spektrometrem. Tato metoda se označuje Membrane Introduction Mass Spectrometry (MIMS), analyt je přiváděn do iontového zdroje přes polymerní membránu. Tato membrána je semipermeabilní a odděluje matici vzorku od nízkotlakého prostředí hmotnostního spektrometru. Membrána může rovněž extrahovat a prekoncentrovat analyt ze vzorku což zvyšuje citlivost. Protože MIMS obchází čisticí a separační kroky poskytuje rychlejší, bez rozpouštědlovou alternativu k chromatografickým metodám. Výhodou MIMS je schopnost oddělit analyt (selektivita), detekovat nízké koncentrace (citlivost) při rychlé časové odezvě. Nevýhodou této techniky je pomalá rychlost molekulárního transportu nepolárních molekul z vody přes membránu. MIMS se používá k přímému měření analytů z plynných, kapalných i pevných vzorků

Membrány se vyrábějí z polydimethylsiloxanu PDMS, silikonu a jiných hydrofobních polymer. Také byla vyvinuta řada speciálních membránových propojení např.: “sheet” membrány a membrány z kapilárních dutých vláken.^{54,56}

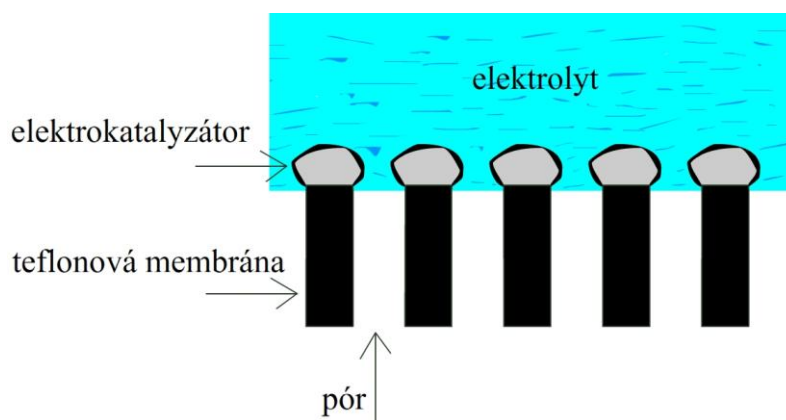
3.3.4. Diferenciální elektrochemická hmotnostní spektrometrie

Spojení dvoustupňového vakuového systému a nejčastěji cyklické voltametrie, umožnilo simultánní a rychlou on-line hmotnostně spektrometrickou detekci těkavých produktů elektrochemické reakce. Tato metoda dostala název “diferenciální elektrochemická hmotnostní spektrometrie” (DEMS).⁵⁴

Dosud se DEMS nepoužívá pro čistě analytické účely v komerční sféře ale spíše ve výzkumných laboratořích. Nicméně tato technika umožňuje takové nastavení, které je v zájmu vědců pracujících na poli heterogenní katalýzy v kapalně fázi. V porovnání s technikou elektrospreje je více kvantitativní a tudíž velkou výhodou DEMS je získávání semikvantitativních hodnot reakčních poměrů.⁵⁷

3.3.4.1. Typy cel pro DEMS

Aby bylo možné detekovat produkty tvořené na povrchu elektrody v roztoku běžným hmotnostním spektrometrem, musí být tyto produkty transportovány z elektrolytické fáze do vakua. Nezbytnou částí DEMS je tedy membrána, která separuje elektrolyt od vakua ale propouští těkavé látky. Další požadavek je, že doba transportu produktů od elektrody k membráně musí být malá. Tento problém se dá vyřešit pro vodné systémy a některá organická rozpouštědla (např. propylen karbonát) použitím teflonové membrány. Díky její hydrofobicitě, kapalina nepenetruje skrz membránu, kdežto rozpuštěné plyny a další těkavé molekuly se přímo odpařují v pórech. Velikost póru je závislá na povrchovém napětí elektrolytu a na úhlu kontaktu mezi kapalinou a teflonem. Teflonová membrána je většinou podepřena skleněnou nebo ocelovou fritou. Pro rychlý převod molekuly do vakua musí být elektroda umístěna co nejbližší membráně aby difusní transport byl dostatečně rychlý, případně se musí použít přídavná konvekce Obrázek 10 ukazuje schéma elektrody s teflonovou membránou.⁵⁷



Obr. 10 Schéma elektrody s teflonovou membránou (tzv. „sputtered“ elektrody)⁵⁷

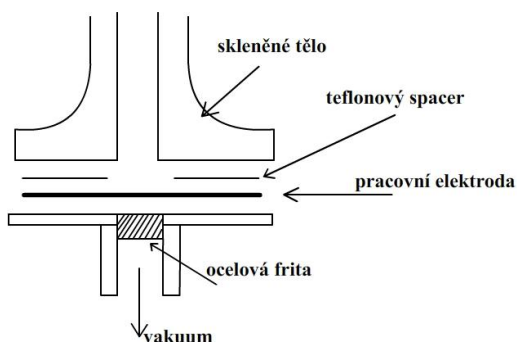
3.3.4.1.1. Klasická ceta pro DEMS

V klasickém uspořádání je elektrokatalytická vrstva, např. Pt, upevněna na teflonovou membránu. Typická vrstva katalyzátoru má tloušťku od 50 do 80 nm. Typická ceta je optimalizována pro malý objem. To umožňuje použít drahé isotopicky značené sloučeniny pro studium mechanismů. Tělo cely je většinou z teflonu nebo skla, elektroda je chráněna proti mechanickému poškození umístěním na ocelovou fritu. Čas odezvy experimentu byl

stanoven na 0,1 s. Nevýhodou je nižší mechanická stabilita. Uspořádání klasické cely je na obrázku 11.⁵⁷

3.3.4.1.2. Rotační elektroda

V klasické elektrochemii se rotační elektrody používají, protože mají urychlený a dobře definovaný transport hmoty. V některých případech je zajímavé použít rotační porézní elektrodu jako vstup do hmotnostního spektrometru.⁵⁷

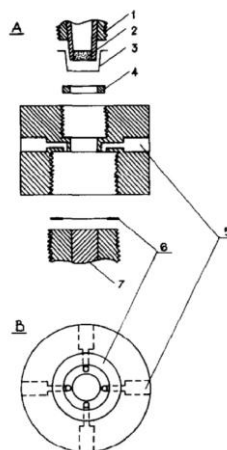


Obr. 11 Klasická cela pro DEMS⁵⁷

3.3.4.1.3. Cely umožňující použití velkých elektrod: tenkovrstevná cela

Pro použití velkoplošných elektrod pro DEMS, např. elektrod z monokrystalu, byla vyvinuta tenkovrstevná cela. Její schéma je na obrázku 12. Velká elektroda s průměrem 1 cm je oddělena od porézní teflonové membrány 50 až 100 μm vrstvou elektrolytu. Tělo cely je zhotoveno z pasivovaného titanu pro jeho mechanickou stabilitu a inertnost. Dvě kapiláry umístěné na opačných stranách slouží jako přítok a odtok elektrolytu a jako spojení s pomocnou a referenční elektrodou. Je možné použít dvě pracovní elektrody, na přítoku a odtoku.

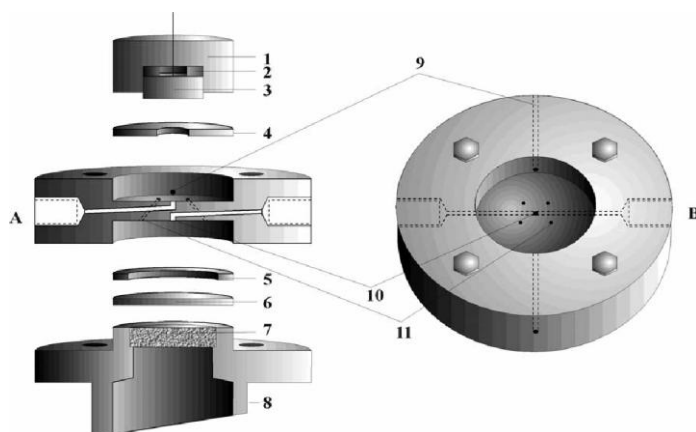
Toto uspořádání je možné použít pro desorpční experiment stejně jako pro měření stupně formování produktu během faradaických reakcí.⁵⁸



Obr. 12 (A) Boční pohled; 1 – teflonová podpěra, 2 – porézní skleněná fritta, 3 – teflonová membrána, 4 – teflonový kroužek, 5 – přítok a odtok elektrolytu, 6 – teflonová vložka, 7 – pracovní elektroda. (B) Spodní pohled⁵⁸

3.3.4.1.4. *Duální tenkovrstevná cela pro kontinuální elektrolýzu*

Pro faradaické reakce, které musí být prováděny za podmínek kontinuálního toku elektrolytu za účelem rychlého vyčerpání reaktantů v tenkovrstevné cele, se lépe hodí duální tenkovrstevná cela znázorněná na obrázku 13. Kompletní cela se skládá ze dvou oddělených prostor pro elektrochemii a detekci hmotnostní spektrometrií. Elektrolyt nejprve vstoupí do tenkovrstevného prostoru před elektrodou (“wall-jet”) a potom protéká přes jednu ze čtyř (nebo šesti) kapilár do spodního prostoru (“detekční cela”), kde produkty dosáhnou teflonové membrány. Tato cela poskytuje výhodu kombinací s křemennými mikrováhami.⁵⁷



Obr. 13 1 – podpěra, 2 – elastické kroužkové těsnění, 3 – monokrystal, 4,5 – teflonová vložka, 6 – porézní teflonová membrána, 7 – ocelová fritta, 8 – ocelové spojení s

MS, 9 – kapilára pro proplachování Ar, 10 – kapiláry pro přítok a odtok, 11 – spojující kapiláry, (A) boční pohled, (B) vrchní pohled⁵⁷

3.3.4.1.5. “Pinhole” vstup

Jedná se o další přístup pro použití velkých elektrod. Zde je přívod plynu zajištěn otvorem (pinhole) o průměru několika mikrometrů, umístěném v polokruhovém konci skleněné trubice, která je pokryta tetlonovým filmem. Výhoda je v malém celkovém objemu substance vstupující do hmotnostního spektrometru, přes pinhole.⁵⁷

3.4. EC/HPLC/MS

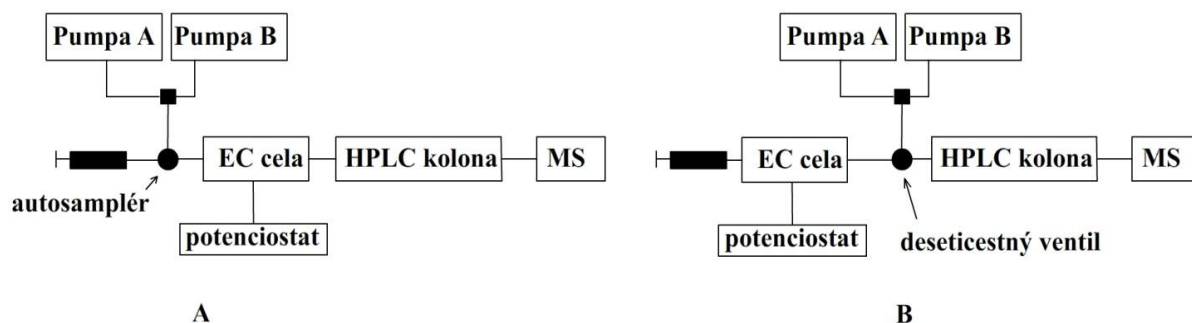
V dnešní době je spojení elektrochemické cely s hmotnostním spektrometrem rozšířeno o kapalinovou chromatografii (EC/LC/MS). Tento systém je úspěšně používán k simulaci metabolismu mnoha látek. Oxidovaný metabolit je generován v elektrochemické cele, pro rozdělení případných izomerů a rozlišení polaritý produktů je zapojen kapalinový chromatograf a separované látky jsou detekované hmotnostním spektrometrem. On-line spojení EC-LC-MS dokáže přímo detekovat velmi krátce „žijící“ sloučeniny, které často nemohou být analyzovány v biologických systémech. Dále pak můžeme toto uspořádání využít při studiu reaktivity metabolitů s takovými sloučeninami jako jsou proteiny nebo DNA a tudíž stanovit potenciální toxicitu.

Zapojení systému HPLC mezi elektrochemickou celu a hmotnostní spektrometr dovoluje rozlišit např.: polohu hydroxy skupiny na aromatickém jádře po předchozí oxidaci v EC cele, retenční časy poskytují informace o polaritě produktů, referentní sloučeniny mohou být použity k identifikaci z retenčních časů.^{52,53,54,59}

Pro simulaci oxidativního metabolismu léčiv se používá dvojí nastavení systému EC-HPLC-MS. V klasickém průtokovém systému je EC cela umístěna přímo před kolonu a analyt je injektován autosamplerem, schéma je na obrázku 14. Po nastříknutí je látka oxidována a oxidační produkty separovány na koloně a detekovány MS. Při tomto nastavení jsou oxidační podmínky stejné jako nastavení HPLC separace, tj. hodnota průtoku, iontová síla, složení a pH mobilní fáze. To je často zdrojem problémů, např. pokud oxidace vyžaduje fyziologické pH ale separace probíhá v kyselém prostředí. Dále je často potřeba alespoň padesátí procentní

zastoupení organického rozpouštědla při použití coulometrické cely k prevenci adsorpce na povrchu elektrody. To je často nekompatibilní s HPLC separací polárních látek. Tenkovrstevné cely nemohou být zapojeny do tohoto nastavení, díky vysokým průtokům ve vysokotlaké části systému.

Z těchto důvodů byl vyvinut systém používající přepínací ventil pro nástřik jak je zobrazeno na obr. 14. Sloučenina je čerpána konstantní rychlostí přes EC celu použitím stříkačkové pumpy. Eluent z EC cely je zaveden do smyčky, která je zapojená do deseticestného ventilu. Nástřik na kolonu je proveden otočením ventilu. Výhodou tohoto nastavení je použití různých podmínek oxidace a separace.⁵¹



Obr. 14 Dvě různá zapojení EC-HPLC-MS systému⁵¹

Kapalinová chromatografie

Pro separaci oxidačních produktů jsou vhodné kolony s obrácenými fázemi. Nejčastěji používané stacionární fáze jsou C₈ a C₁₈. Hydroxylační a N-dealkylační produkty mají oproti původní látce nižší retenci, zatímco dehydrogenační produkty, zvláště chinony mají vyšší retenci. Jelikož molekuly léčiv často obsahují aromatický kruh, fenylové fáze mohou poskytnout zlepšenou selektivitu v porovnání s alkylovými fázemi.⁵¹

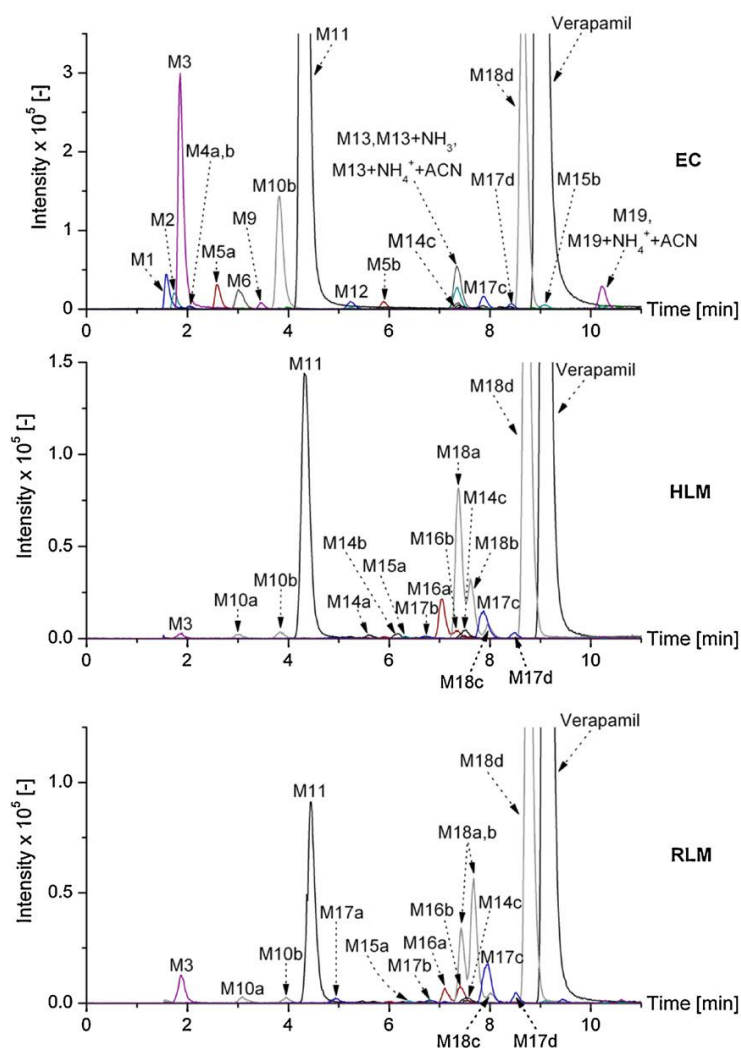
Hmotnostní spektrometr

K inozaci se používají techniky pracující za atmosférického tlaku, hlavně ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Obě metody umožňují převod eluentu z LC kolony do plynné fáze a jeho ionizaci. Nejčastější mechanismy jsou protonace (pozitivní mód) a deprotonace (negativní mód) u polárních sloučenin, resp.

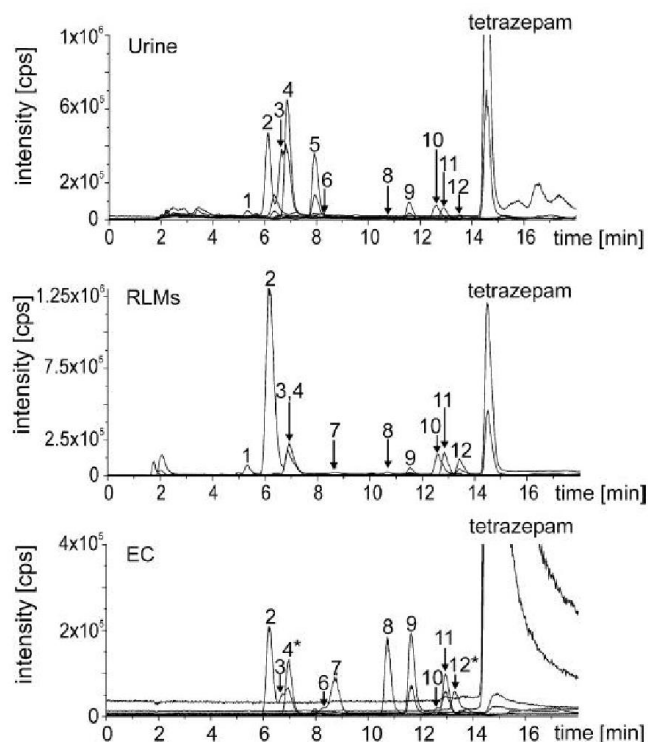
Tvorba ductů s ionty Na^+ nebo NH_4^+ v pozitivním módu či s Cl^- nebo acetátovými ionty v pro negativní módu.⁶⁰

3.4.1. Srovnání s mikrozomálními metodami

Jak již bylo zmíněno, mechanismus enzymatických reakcí a reakcí elektrochemických je rozdílný, nicméně obě metody poskytují celkem shodné výsledky. Tabulka 4 uvádí přehled metabolických reakcí fáze I a možnosti jejich elektrochemické simulace. Byla analyzována řada látek a to jak mikrozomálním tak elektrochemickým přístupem. Obrázek 15 ukazuje srovnání LC/MS chromatogramů pro EC simulaci, metabolitů z lidského a krysího těla látku verapamil a obrázek 16 pro tetrazepam.⁵³



Obr. 15 Srovnání LC/MS chromatogramů pro látku Verapamil, EC – elektrochemická oxidace, HLM – mikrozomy lidských jater, RLM – mikrozomy krysích jater⁵³



Obr. 16. Srovnání LC/MS chromatogramů pro tetrazepam, EC – elektrochemická oxidace, RLM – mikrozomy krysích jater, URINE – lidská moč⁵²


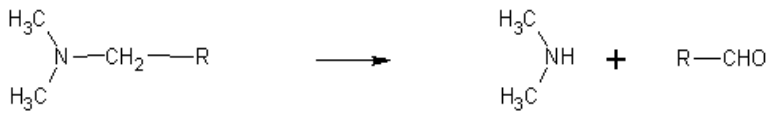


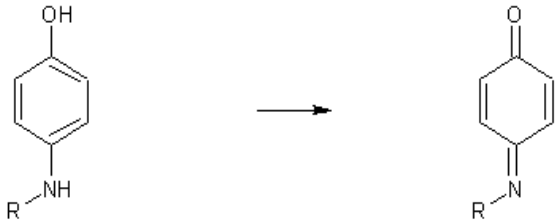
Karst a kol. dokázali elektrochemicky napodobit metabolickou degradaci tetrazepamu na diazepam. Ve své práci porovnávali výsledky z *in vivo* testů moči, *in vitro* výsledků z mikrozomálních experimentů a EC/HPLC/MS experimentů, porovnání výsledků je na obrázku 16.⁵²

Technika spojení EC/HPLC/MS má také významné využití při detekci reaktivních metabolitů. Tyto reaktivní intermediáty mohou být hrubě rozděleny na elektrofilny a volné radikály. Většina z nich jsou elektrofilny, které reagují s nukleofily, které obsahují především dusík nebo síru. Vzhledem ke krátké životnosti a nestabilitě reaktivních sloučenin je jejich analýza velmi obtížná. Jednou metodou k jejich analýze je použití tzv. „trapovacího agenta“, který vytvoří stabilní komplex s reaktivním intermediátem. Jako trapovací agenty se používají glutation a další thiolové sloučeniny pro slabé elektrofilny, semikarbazidy, methoxyamíny a kyanid draselný pro silné elektrofilny a 5,5-dimethylpyrolidin –N-oxid pro volné radikály. Nicméně tato technika postrádá přímou detekci reaktivních metabolitů a jejich vlastnosti jsou

určovány zpětně. Online spojení EC/HPLC/MS má velký potenciál v přímém stanovení reaktivních metabolitů. Byl úspěšně napodoben metabolismus fáze I a fáze II clozapinu⁶¹ a detoxifikace paracetamolu⁶² metodou EC/HPLC/MS. Tyto práce ukazují že použití techniky EC/HPLC/MS má potenciál při analýze reaktivních metabolitů.⁶³

Spojením elektrochemické cely s technikou HPLC/MS vzniká účinný nástroj pro objasnění a studování metabolických reakcí. Oxidativní metabolické reakce jsou simulovány elektrochemicky a HPLC/MS separuje a detekuje vzniklé sloučeniny. Přesto standardní *in vivo* a *in vitro* techniky, stejně jako mikrozomální metody, nemohou být čistě instrumentální metodikou nahrazeny, elektrochemie má významné využití v komplementárních studiích. Vytvořením hmotnostního voltamogramu můžeme poskytnout velmi rychlý přehled oxidativně labilních míst v molekule, můžeme také přímo detekovat reaktivní sloučeniny. Touto metodou můžeme také elektrochemicky syntetizovat a izolovat metabolity pro další analýzu, např. strukturní analýzu pomocí NMR.⁵¹

Tab. 4 Typické reakce fáze I a možné elektrochemické simulace⁵¹

Typické reakce katalyzované cytochromem P450		Elektrochemická simulace
$R-CH_2-CH_3 \longrightarrow R-\overset{OH}{\underset{ }{CH}}-CH_3$	alifatická hydroxylace	úspěšně napodobeno při vysokých potenciálech
	benzylová hydroxylace	napodobeno při nízkém výtěžku
	dealkylace aminů	snadno napodobeno
	aromatická hydroxylace	úspěšně napodobeno pro substituované aromáty
	oxidace heteroatomů	S-oxidy a N-oxidy úspěšně napodobeny
$R-CHO \quad H_3C-CH_2-CHO \longrightarrow R-COOH$	oxidace alkoholů a aldehydů	elektrochemicky nenapodobeno
	dehydrogenace	snadno napodobeno

Experimentální část

4.1. Chemikálie

Standard repaglinidu (REP) (Sigma Aldrich, 98 %), destilovaná voda, kyselina boritá 99,5 % (Lachema, Brno), kyselina fosforečná 85 %, p.a. (Lachema, Brno), kyselina octová (Lachema, Brno, p.a.), hydroxid sodný (Lachema, Neratovice, p.a.), chloristan sodný (Fluka, p.a.), metanol (Biosolve, pro LC-MS), octan amonný (Lachema, Neratovice, p.a.).

4.2. Příprava roztoků

Standardní zásobní roztok REP (koncentrace 10 mmol/l) byl připraven navážením příslušného množství standardu REP a jeho rozpuštěním v methanolu. Základní roztok Brittonova – Robinsonova (BR) pufru byl připraven smícháním roztoků kyseliny fosforečné (0,04 mol/l), kyseliny octové (0,04 mol/l) a kyseliny borité (0,04 mol/l).

Pracovní roztoky BR pufru byly připraveny smícháním adekvátních množství základního roztoku BR pufru, hydroxidu sodného (0,2 mol/l) a chloristanu sodného (1 mol/l).

4.3. Přístrojové vybavení

Voltamertická měření byla realizována na Eco-Tribo polarografu (Polaro-Sensors, Praha) v tříelektrodovém zapojení s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku (GCE) (Bioanalytical Systems, USA), referentní nasycenou kalomelovou (SCE) a pomocnou platinovou elektrodou. Voltamogramy byly měřeny v programu PolarPro verze 4 a vyhodnocovány v programu MS Excel.

Pro elektrolýzu byl použit potenciostat/galvanovat 100mA (L-Chem, Horka nad Moravou) v tříelektrodovém zapojení s pracovní platinovou síťkovou elektrodou, pomocnou platinovou a referentní kalomelovou elektrodou. Pomocná elektroda byla umístěna v odděleném katodovém prostoru.

Pro separaci produktů elektrolýzy byl použit modulární systém Acquity UPLC (Waters, Milford, USA) obsahující Acquity PDA detector, Acquity Column Manager, Acquity Sample Manager (autosampler) a Acquity Binary Solvent Manager. Separace byla provedena na koloně Knauer BlueOrchid C18 (Berlin, Německo) (50 mm x 2 mm, 1,8 μ m).

K detekci látek po separaci byl použit hmotnostní spektrometr QqTOF Premier (Waters, Milford, USA) vybavený iontovým zdrojem ESI.

4.4. Pracovní postupy

4.4.1. Voltametrické experimenty

Před každým měřením byl povrch CGE vyleštěn suspenzí nanočásticové aluminy na navlhčené mikrovláknové textílii (Buechler, USA). Poté byl povrch opláchnut destilovanou vodou a elektroda byla umístěna do destilované vody do ultrazvukové lázně po dobu 1 min. Po opláchnutí destilovanou vodou byla elektroda připravena k měření.

Vzorky pro voltametrická měření byly připraveny smícháním základního elektrolytu (ZE), tvořeného 1 ml BR pufru a 0,9 ml vody, s 0,1 ml základního methanolického roztoku REP. Všechna měření se prováděla ve voltametrické nádobce pro měření malých objemů s fritou. Výsledná koncentrace REP ve voltametrické nádobce byla $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

Cyklické voltamogramy byly měřeny s polarizační rychlostí 50 mV/s. Pro sledování závislosti proudu na rychlosti skenu byla polarizační rychlost měněna v rozmezí 20 – 600 mV/s. Registrovány byly dva až tři opakované cykly.

Diferenčně pulzní voltamogramy byly zaznamenány s rychlostí skenu 10 mV/s, výškou pulzu 50 mV a šířkou pulzu 100 ms. Diferenčně pulzní voltametrií a cyklickou voltametrií byla sledována závislost velikosti proudu na koncentraci REP.

4.4.2. Elektrolýza

Simulace metabolismu REP byla provedena oxidací pomocí elektrolýzy. Anodický a katodický prostor byl vzájemně oddělen fritou. Do anodického prostoru bylo přidáno 0,5 ml BR pufru (pH 5 nebo 7,5), 0,4 ml vody a 0,1 REP. Koncentrace REP v elektrochemické cele byla 1 mmol/l, obsah MeOH činil 10 % (v/v). V katodickém prostoru byl základní BR pufr. Elektrolýza byla provedena při různých potenciálech v závislosti na pH pufru. Pro pH 5 to

byly potenciály 300; 700; 800; 1000 a 1250 mV a pro pH 7,5 potenciály 200; 650; 750; 900 a 1100 mV (proti SCE). Doba elektrolýzy byla 30 minut.

4.4.3. HPLC separace s MS detekcí

Vzorky po elektrolýze se před HPLC/MS analýzou naředily MeOH. Výsledný obsah metanolu ve vzorcích o pH 5 byl 56 % (v/v) a ve vzorcích o pH 7,5 byl 44 % (v/v). Mobilní fáze I sestávala z 1% kyseliny octové v 10% MeOH (rozpouštědlo A) a z MeOH (rozpouštědlo B), gradientová eluce měla následující průběh (% v/v) 0 – 8 min (30 – 90 % B), 8 – 9 min (90% B), 9 – 10 min (90 – 30 % B), 10 – 12 min (30% B). Rychlost průtoku mobilní gáze byla 0,25 ml/min, teplota autosampleru a kolony byla 25°C, objem nástřiku byl 3 µl. Toto nastavení bylo použito pro negativní mód ionizace.

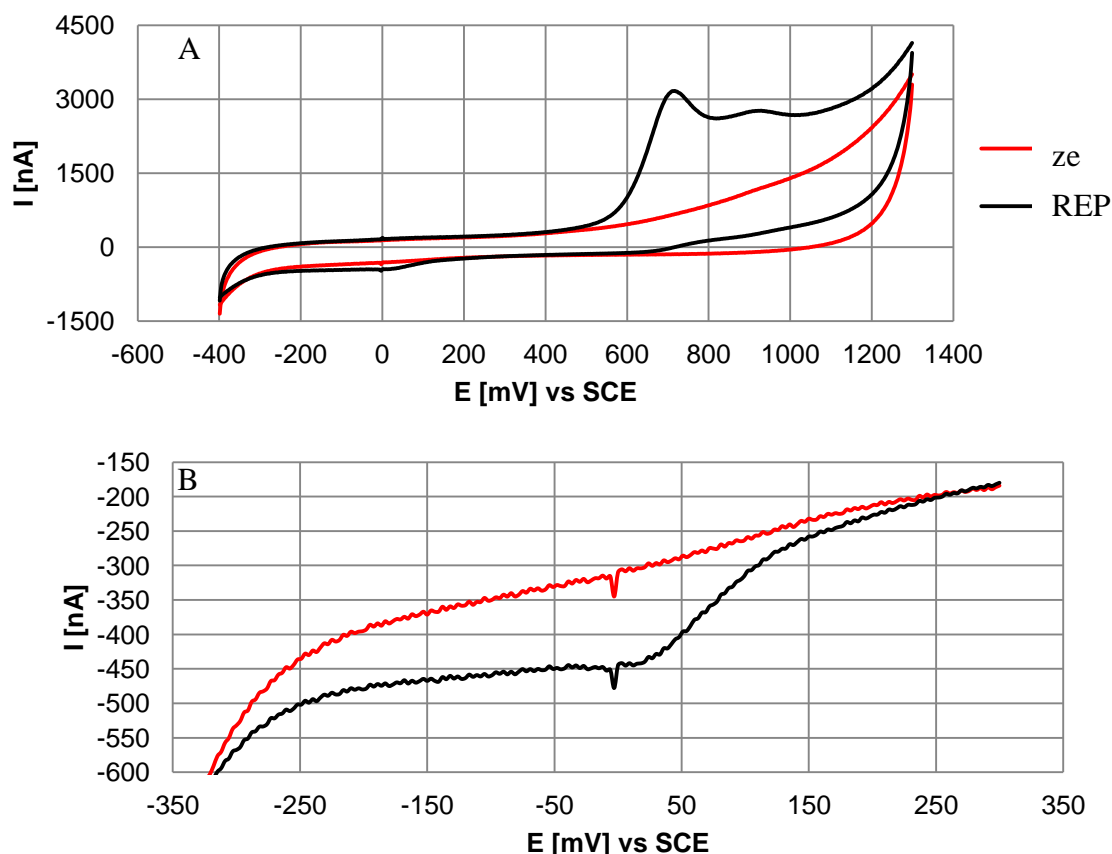
Mobilní fáze II sestávala z 0,01 mol/l octanu amonného (rozpouštědlo A) a z MeOH (rozpouštědlo B) pro pozitivní mód ionizace. Gradientová eluce, rychlost průtoku, teplota a objem nástřiku byly stejné jako u negativního módu.

Parametry iontového zdroje elektrospreje byly: napětí na spojovací kapiláře 3 kV (pozitivní i negativní mód), teplota iontového zdroje 100°C, teplota desolvatačního plynu 150°C, průtoky plynů: zamlžovací 450 l/hod (pozitivní mód), respektive 400 l/hod (negativní mód), cone gas flow 38 l/hod (pozitivní mód), respektive 30 l/hod (negativní mód). Nižší kolizní energie byla 5 eV a vyšší kolizní energie byla v rozsahu 10 – 30 eV. Dusík byl použit jako desolvatační plyn a argon jako kolizní plyn.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Cyklický voltamogram REP

Na cyklickém voltamogramu, (obr. 17 A) jsou patrné dva píky v anodické oblasti při potenciálech okolo 720 mV a 900 mV a při obráceném katodickém skenu jeden pík s potenciálem kolem 0 mV (obr. 17 B).



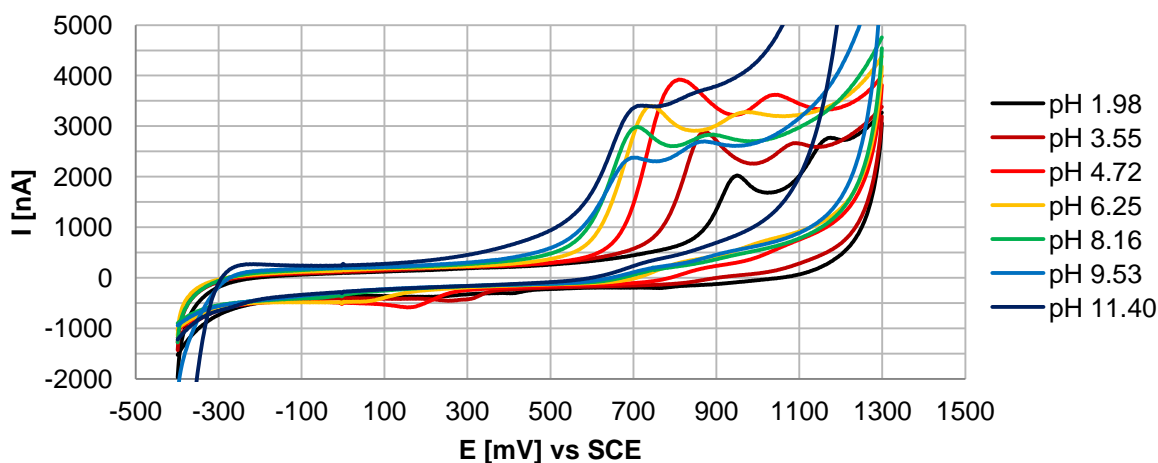
Obr. 17 Cyklický voltamogram REP $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l, A – celý voltamogram, B – detail katodického píku, $v = 50$ mV/s, ZE: BR pH 7,0 s 5% MeOH (v/v)

Z výše uvedeného tedy plyne, že anodická oxidace REP probíhá ve dvou krocích a vzniká při ní elektroaktivní produkt, který je redukován v obráceném směru polarizace.

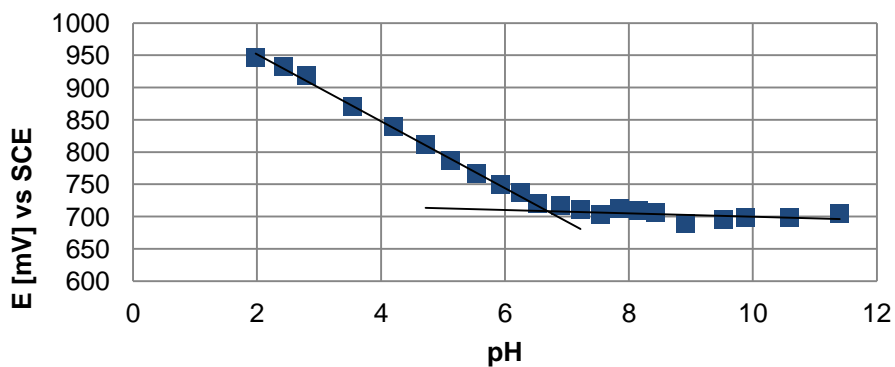
5.2. Závislost na pH

Bylo sledováno elektrochemické chování REP při různých pH. Cyklické voltamogramy pořízené při různých hodnotách pH jsou na obrázku 18. Závislost potenciálu

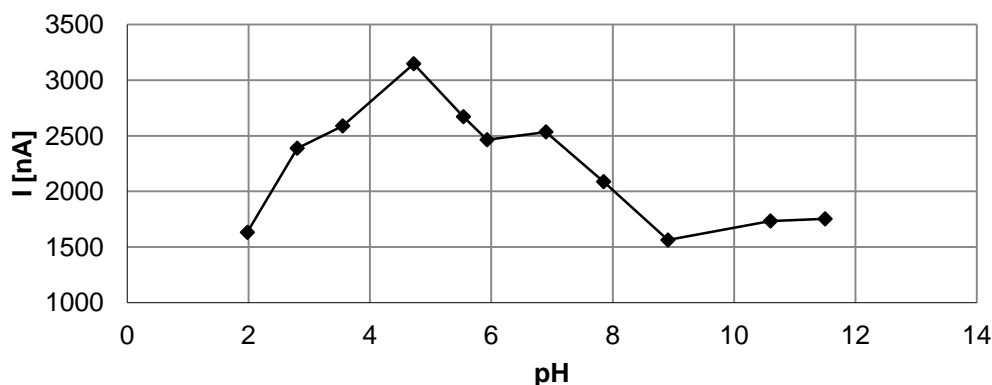
píku na pH (obr. 19) je tvořena dvěma lineárními úseky, jejichž průsečík při pH = 6,13 odpovídá disociační konstantě redukované formy REP. Tato hodnota je ve shodě s literaturou, která uvádí hodnoty pK v rozmezí 6,01 – 6,20.² Na obrázku 20 je uveden graf, který ukazuje závislost proudu prvního anodického píku na různých hodnotách pH BR pufru. Uvedené hodnoty proudu jsou průměrem ze série dvou měření. Maximální hodnota byla získána pro pH 4,7. Tato hodnota pH byla proto zvolena pro další experimenty.



Obr. 18 Cyklické voltamogramy REP $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l při různých pH, $v = 50$ mV/s, ZE s 5 % MeOH (v/v)



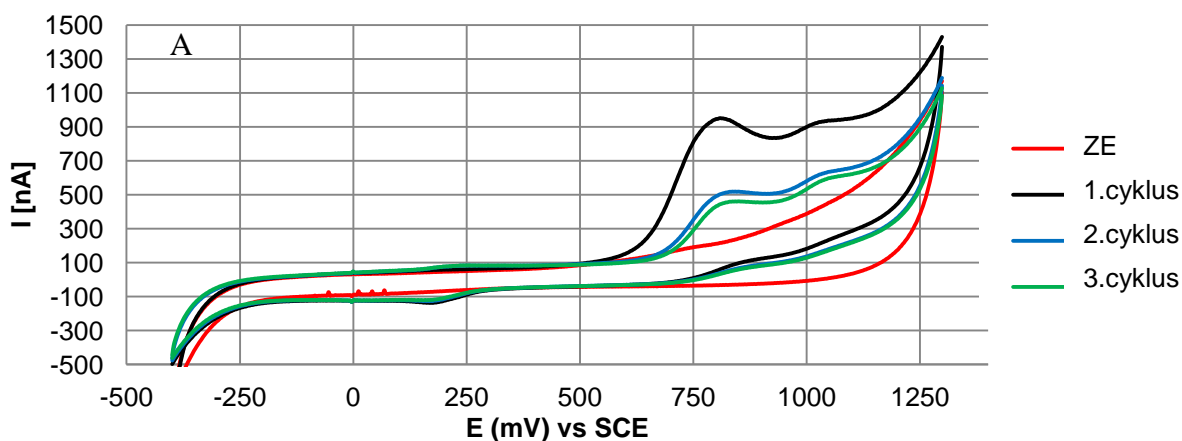
Obr. 19 Graf závislost potenciálu prvního píku na hodnotě pH

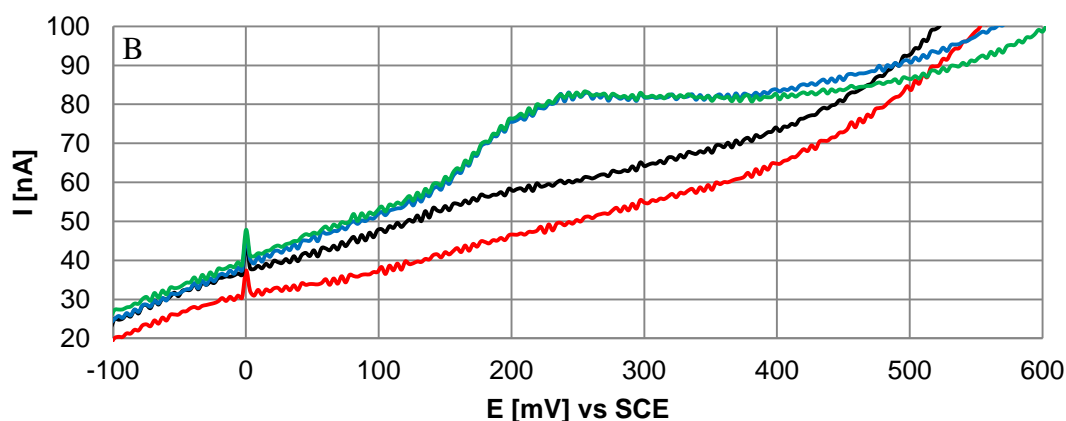


Obr. 20 Závislost velikosti proudu prvního píku REP na pH

5.3. Opakované cyklické voltamogramy REP

Při experimentech, kdy byla nastavena 2 a více opakování cyklů v jednom měření, se objevil nový pík. V prostředí pH 4,7 se anodické píky, odpovídající oxidaci REP, nacházejí okolo potenciálu 800 mV a 1050 mV. Z voltamogramu na obrázku 21 B, je patrné, že nový pík vznikl při druhém anodickém skenu kolem hodnoty potenciálu 200 mV a tvoří redoxní pár s výše popsaným katodickým píkem, který byl pozorován v obráceném směru polarizace (obr. 17). Z toho lze usoudit, že při prvním anodickém skenu, vzniká oxidací REP produkt, který podléhá elektrodové reakci při nižších kladných potenciálech. Rozdíl potenciálu katodického a anodického píku tohoto produktu je 81 mV což ukazuje na částečnou reverzibilitu sledovaného systému. S rostoucím pH se posouvají potenciály obou píku k nižším hodnotám, což ukazuje na účast protonů v elektrochemické reakci produktu. Podobné kvazireverzibilní chování, závislé na pH, je známé např. u systémů chinon/dihydroxybenzen.⁷²





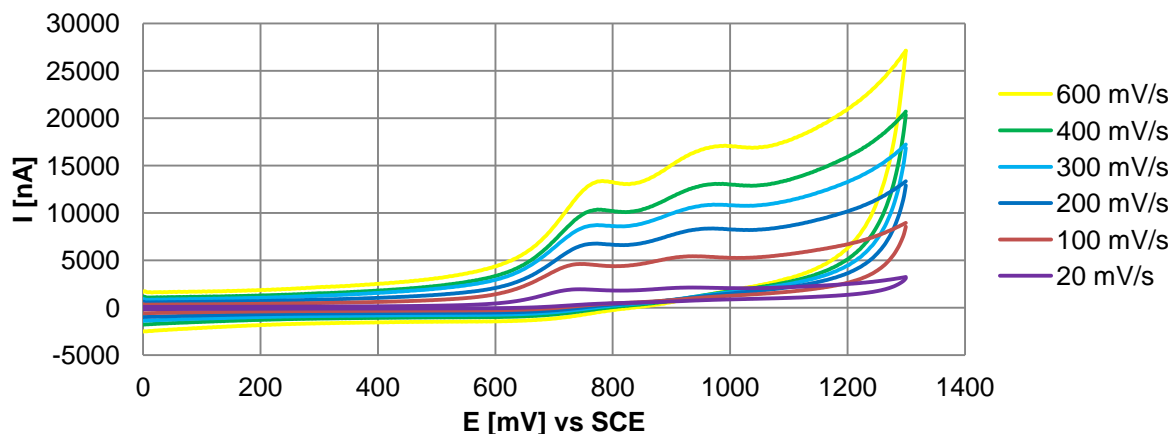
Obr. 21 Cyklický voltamogram REP $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l, A – celý voltamogram, B – detail nového anodického píku, $v = 50$ mV/s, ZE: BR pH 4,7 s 5 % MeOH (v/v)

Z voltamogramu (obr. 21 A) je rovněž patrný pokles proudu anodických píků REP ve druhém skenu. To může souviset s adsorpcí nově vzniklého produktu na pracovní elektrodu. Nově vzniklá sloučenina je tedy pravděpodobně povrchově aktivní, tvoří na povrchu elektrody adsorbovanou vrstvu, která zabraňuje přístupu molekul REP a tím jeho oxidaci.

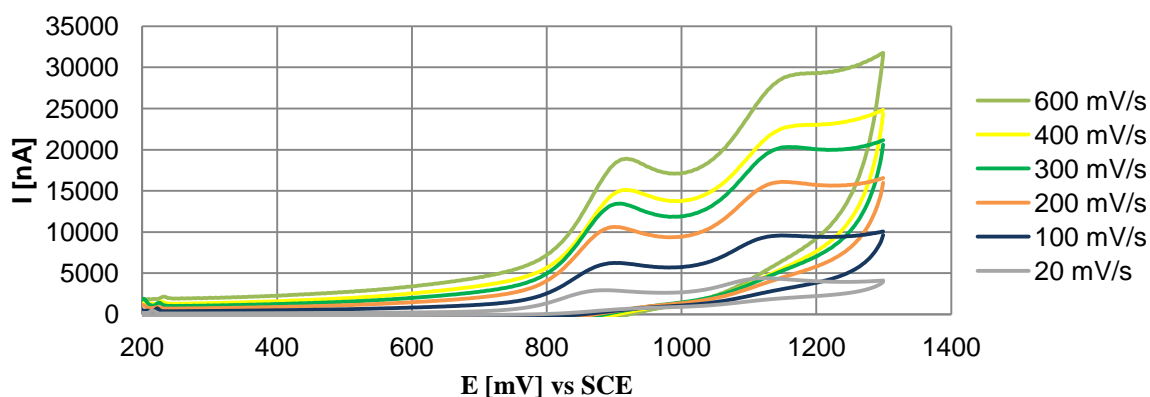
5.4. Závislost na rychlosti skenu

Byla sledována závislost proudové odezvy na změně rychlosti skenu. Měření byla provedena v kyselém a neutrálním prostředí.

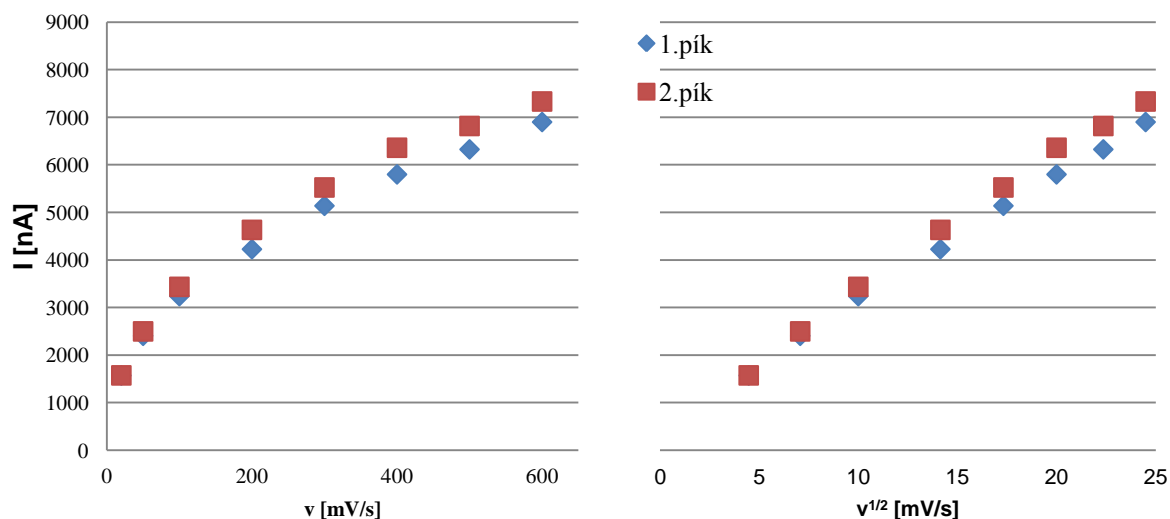
Ze závislosti na rychlosti skenu můžeme usoudit, který děj je klíčový v elektrochemické reakci. Přímá úměra mezi výškou píku a odmocninou z rychlosti polarizace platí pro děje řízené difúzí. U dějů, které jsou řízeny adsorpcí je výška píku přímo úměrná rychlosti polarizace.⁷³ S rostoucí rychlostí polarizace elektrody hodnota anodického proudu roste, obrázek 22 (pH 7,8) a obrázek 23 (pH 3,4). Na obrázku 24 je graf závislosti proudu na rychlosti a odmocnině rychlosti polarizace při neutrálním pH (7,8), na obrázku 25 potom závislost logaritmu proudu na logaritmu rychlosti skenu. Podobně na obrázcích 26 a 27 jsou tyto pro kyselé prostředí pH 3,4. V obou prostředích s rostoucí rychlostí polarizace roste anodický proud obou píků.



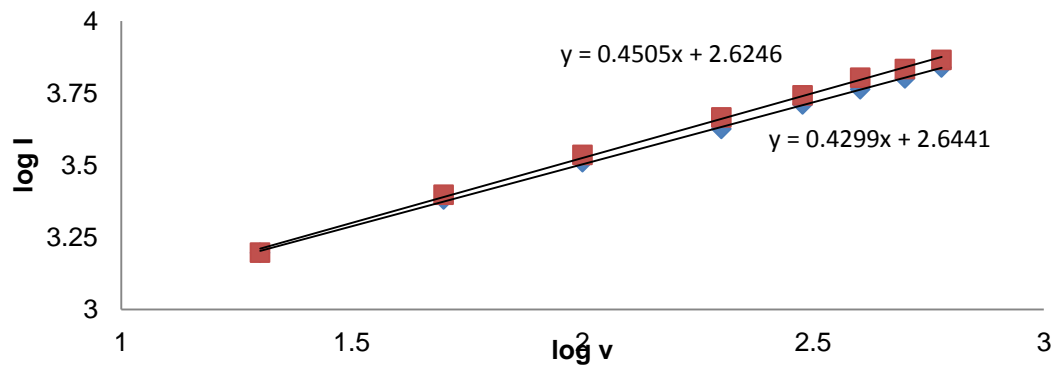
Obr. 22 Cyklické voltamogramy REP $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l při různých rychlostech skenu,
ZE: BR pH 7,8 s 5 % MeOH (v/v)



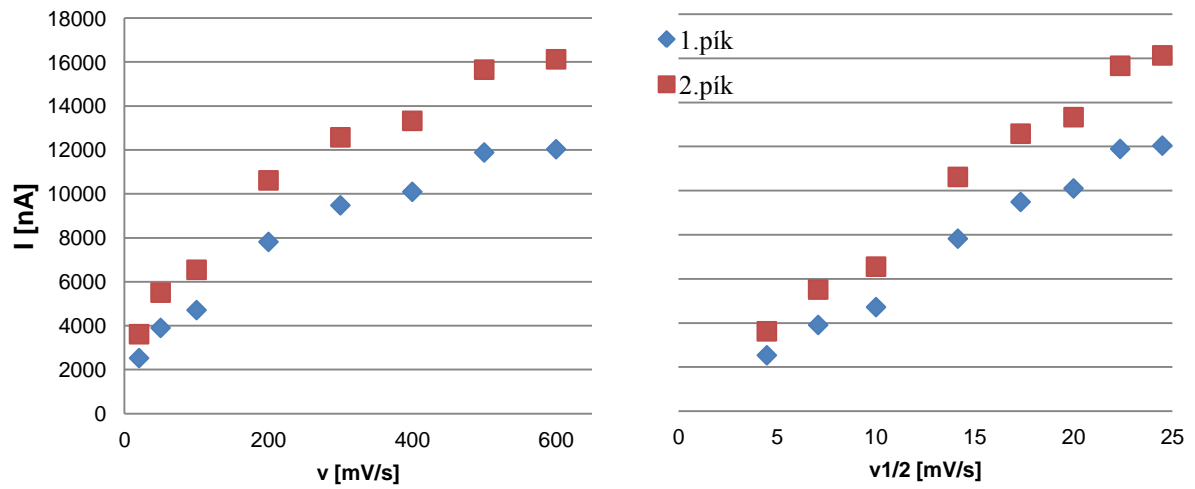
Obr. 23 Cyklické voltamogramy REP $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l při různých rychlostech skenu,
ZE: BR pH 3,4 s 5 % MeOH (v/v)



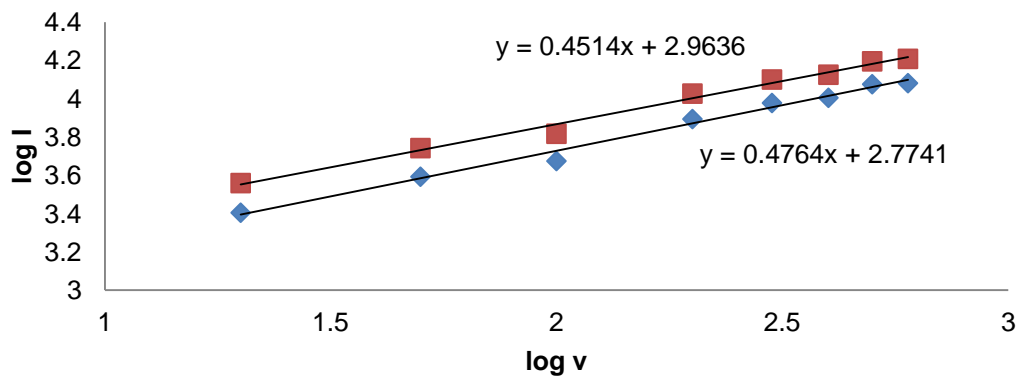
Obr. 24 Závislost proudu REP $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l na rychlosti a odmocnině rychlosti skenu pro
pH = 7,8



Obr. 25 Závislost log proudu na log rychlosti skenu ■ – první pík, ◆ - druhý pík, pH 7,8



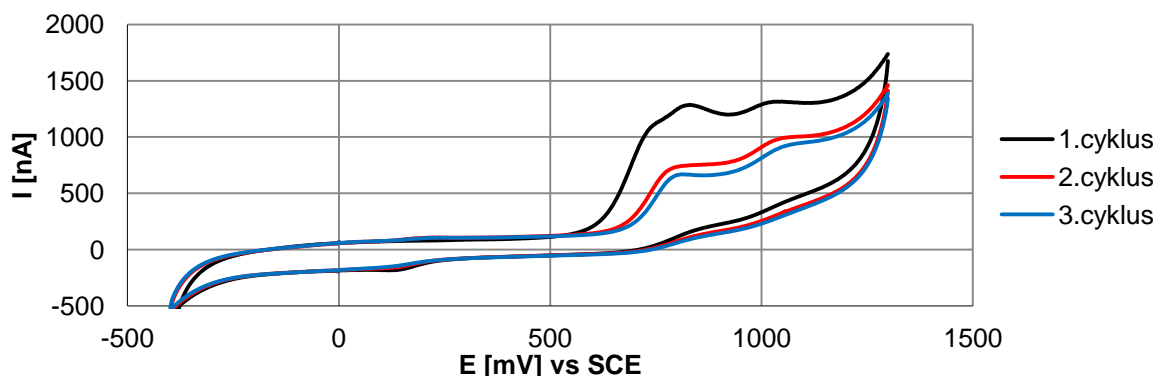
Obr. 26 Závislost proudu REP $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l na rychlosti a odmocnině rychlosti skenu pro pH = 3,4



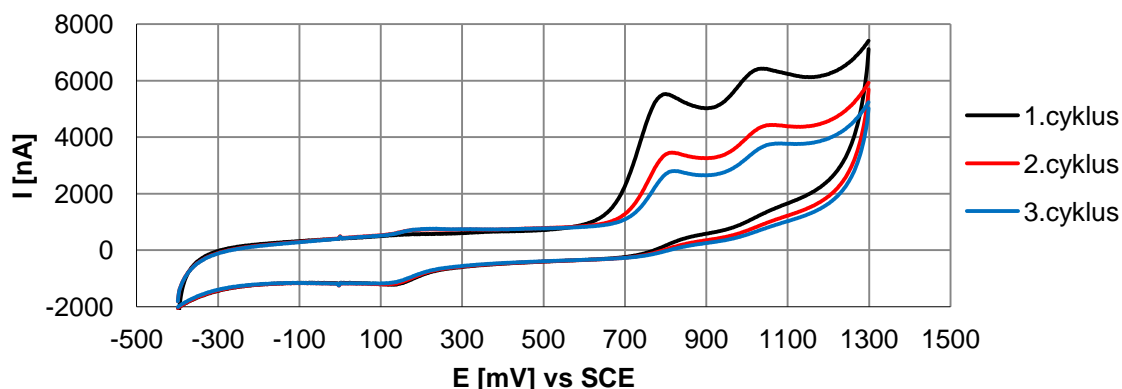
Obr. 27 Závislost log proudu na log rychlosti skenu ■ – první pík, ◆ - druhý pík, pH 3,42

Z uvedených grafů vyplývá, že řídicím procesem elektrodové reakce je pravděpodobně difúze. Směrnice přímky z logaritmických závislostí se pohybuje okolo hodnoty 0,45 což je blízko teoretické hodnotě 0,5.

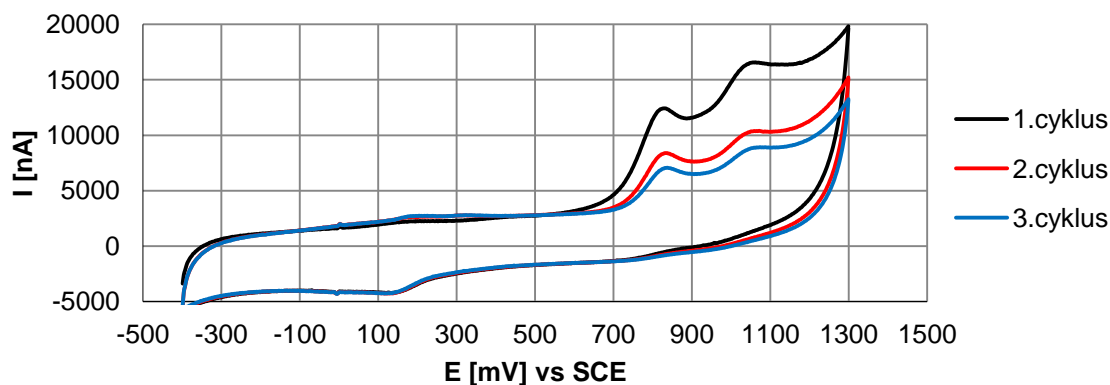
Na obrázku 28 je graf znázorňující cyklický voltamogram REP při rychlosti skenu 10 mV/s a třech opakovaných cyklech. U prvního anodického píku můžeme pozorovat při prvním skenu rozštěpení. U dalších opakovaných cyklů se toto rozštěpení neobjevuje. Takové rozštěpení píku může být způsobeno vřezwnou chemickou reakcí, která komplikuje celkový elektrodový děj. Při vyšších polarizačních rychlostech (obr. 29 a 30) není rozštěpení prvního anodického píku patrné.



Obr. 28 Cyklický voltamogram REP $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l
 $v = 10$ mV/s, ZE: BR pH 4,7 s 5 % MeOH (v/v)



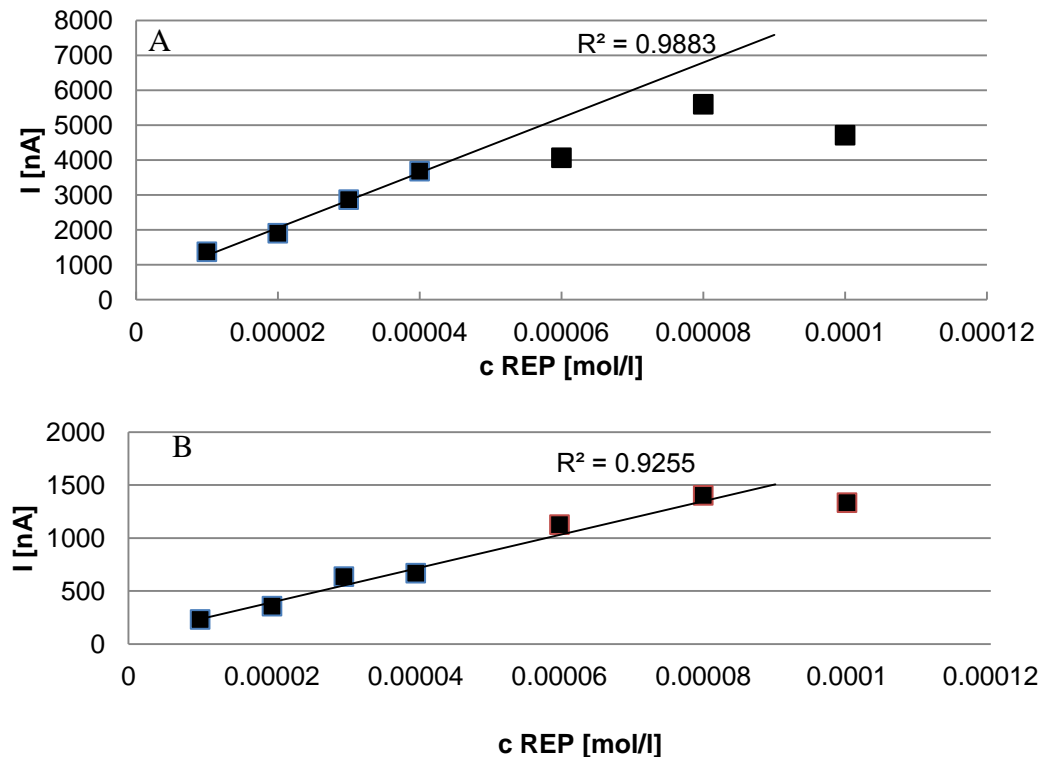
Obr. 29 Cyklický voltamogram REP $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l
 $v = 100$ mV/s, ZE: BR pH 4,7 s 5 % MeOH (v/v)



Obr. 30 Cyklický voltamogram REP $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l
 $v = 500$ mV/s, ZE: BR pH 4,7 s 5 % MeOH (v/v)

5.5. Závislost na koncentraci

Závislost velikosti proudu na koncentraci REP byla měřena metodami CV a DPV v prostředí BR pH 4,9 v ZE obsahujícím 5 % MeOH. Koncentrace REP byla v rozmezí $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l až $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Počáteční potenciál byl nastaven na hodnotu -400 mV a konečný na 1300 mV. Na obrázku 31 je graf závislosti proudové odezvy na koncentraci REP.

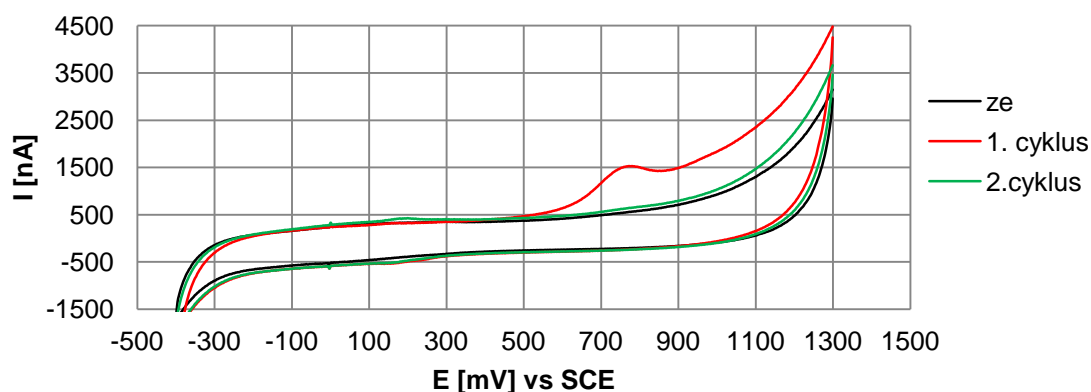


Obr. 31 Kalibrační závislost REP A – cyklická voltametrie, B – diferenčně pulzní voltametrie,
 ZE: BR pH 4,9 s 5 % MeOH (v/v)

Kalibrační závislosti jsou lineární pouze v omezeném rozsahu nižších koncentrací REP. Při vyšších koncentracích se zakřivují, což indikuje adsorpci REP nebo jeho oxidačních produktů na povrch elektrody.

5.6. Adsorpce REP na povrch uhlíkové elektrody

Tendence REP adsorbovat se na povrch uhlíkové elektrody byla testována následujícím experimentem. Elektroda s obnoveným povrchem byla ponořena do roztoku REP koncentrace 10 mmol/l na dobu 30 s. Poté byla z roztoku vyjmuta, důkladně opláchnuta proudem destilované vody, vložena do čistého základního elektrolytu (pH 4,7) a byl změřen cyklický voltamogram. Jak ukazuje obr. 32, na voltamogramu byl pozorován pík REP s potenciálem 800 mV v prvním anodickém skenu i dvojice píků oxidačního produktu při potenciálu kolem 200 mV. V následujících cyklech již nebyl pozorován pík oxidace REP při 800 mV, avšak píky oxidačního produktu byly zřetelné ještě v následujících cyklech.

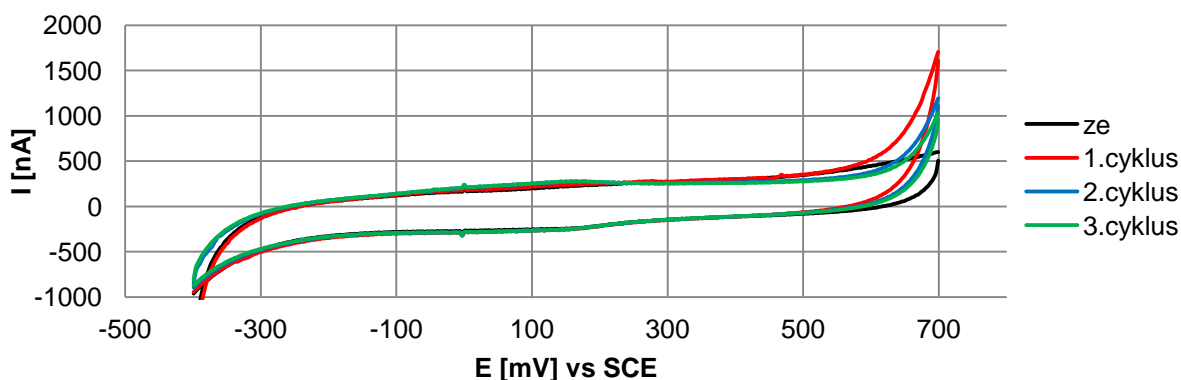


Obr. 32 Cyklický voltamogram po ponoření elektrody v roztoku REP,
 $v = 50 \text{ mV/s}$, ZE: BR pH 4,7

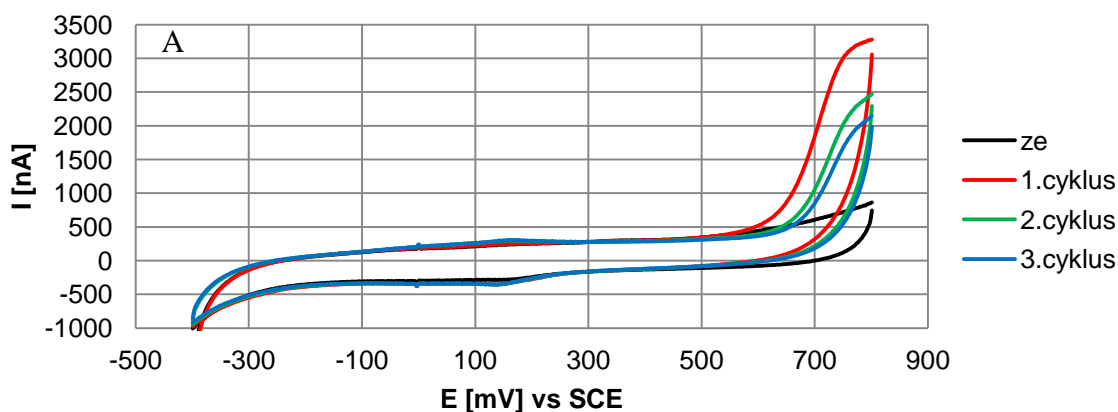
Z tohoto experimentu lze soudit, že REP se spontánně adsorboval na povrch elektrody ponořené do jeho roztoku. V čistém elektrolytu se pak adsorbovaná vrstva REP ireverzibilně oxidovala během prvního anodického skenu. V následujících skenech byla zaznamenána pouze odezva oxidačního produktu, který zůstal adsorbovaný na elektrodě.

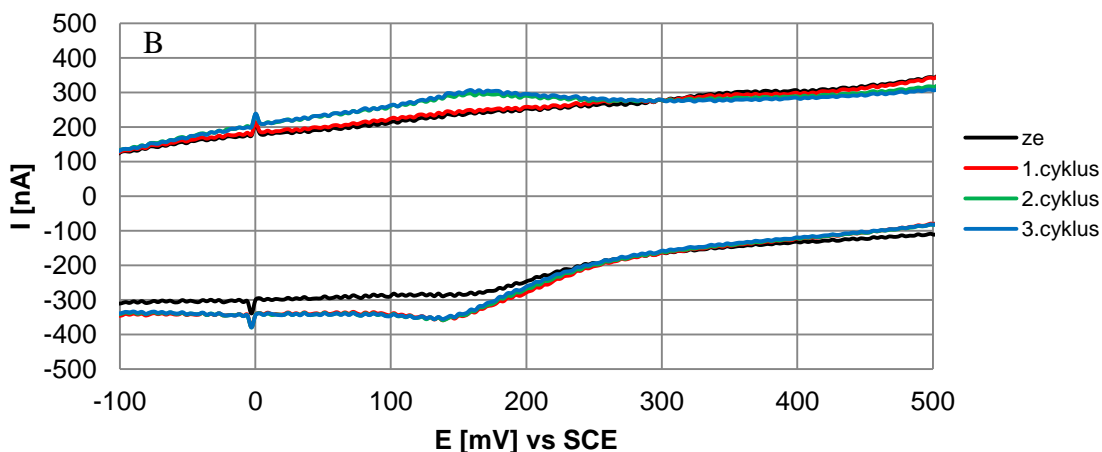
5.7. Vliv změny přepínacího potenciálu

Pro zjištění, v kterém oxidačním kroku, vzniká pozorovaný elektroaktivní oxidační produkt REP, byla provedena série měření, při kterých se měnil rozsah potenciálového okna cyklických voltamogramů. Počáteční potenciál byl stále stejný -400 mV a hodnoty konečného potenciálu byly 700 mV, 730 mV, 800 mV, 900 mV a 1100 mV. Potenciály byly voleny tak aby pokryly potenciály oxidačních píků před oxidací, v polovině píku, maximu, za maximem. Na obrázcích 33 - 35 jsou grafy cyklických voltamogramů pro různá potenciálová okna. Z grafů je zřejmé, že látka odpovědná za vznik nových píků, se tvoří v prvním kroku elektrodové reakci. Tedy kolem hodnoty potenciálu 800 mV.

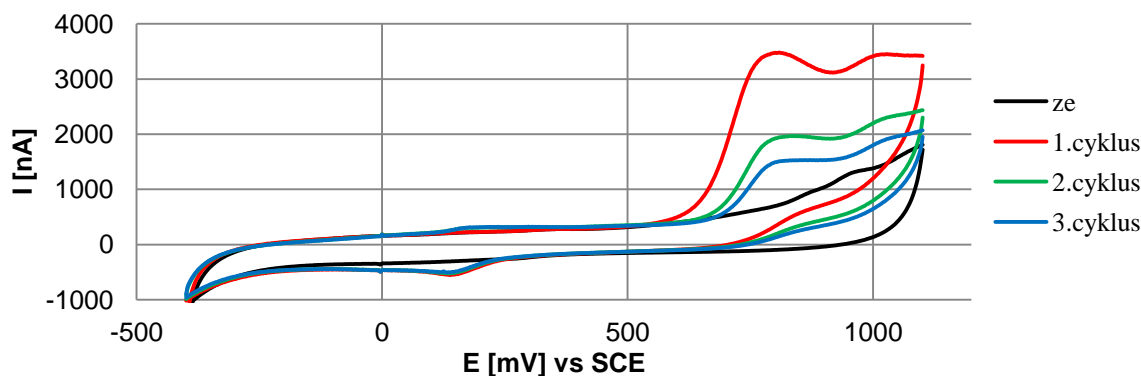


Obr. 33 Cyklický voltamogram REP 5×10^{-5} mol/l, $v = 50$ mV/s
ZE: BR pH 4,7 s 5 % MeOH (v/v), -400 až 700 mV





Obr. 34 Cyklický voltamogram REP $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $v = 50$ mV/s
 ZE: BR pH 4,7 s 5 % MeOH (v/v), -400 až 800 mV
 A – celý voltamogram, B – detail nového píku

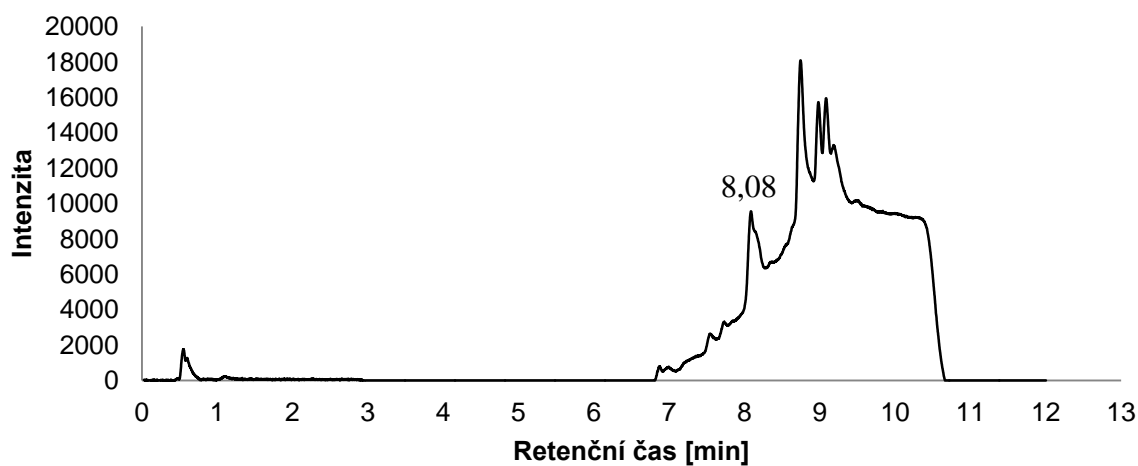


Obr. 35 Cyklický voltamogram REP $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $v = 50$ mV/s
 ZE: BR pH 4,7 s 5 % MeOH (v/v), -400 až 1100 mV

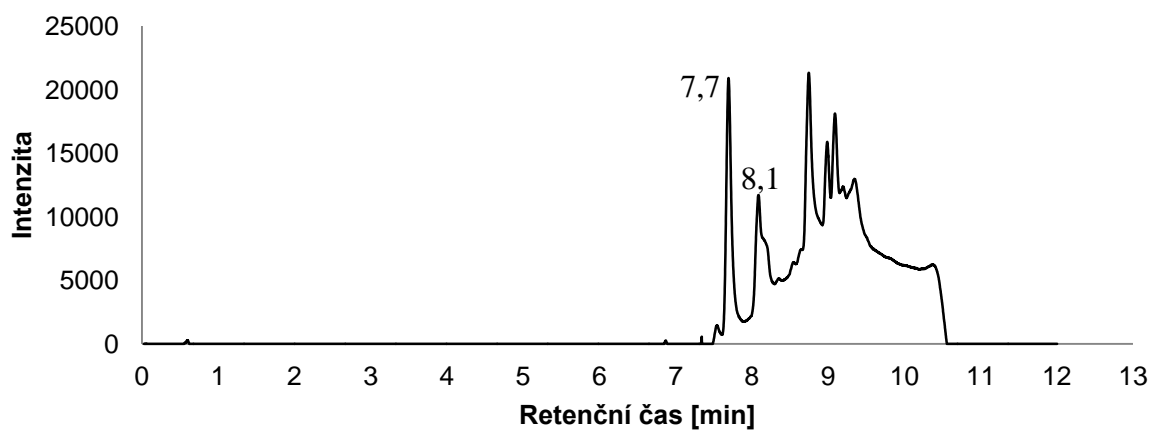
5.8. Elektrolýza REP s HPLC/MS analýzou oxidačních produktů

5.8.1. HPLC/MS analýza REP

Analýzou chromatogramů získaných pro slepý pokus (čistá MF) a standardu REP byl zjištěn retenční čas REP. Obrázky 36 a 37 ukazují chromatogram slepého pokusu a standardu REP. Po separaci na koloně byly látky detekovány detektorem diodového pole a hmotnostním spektrometrem.

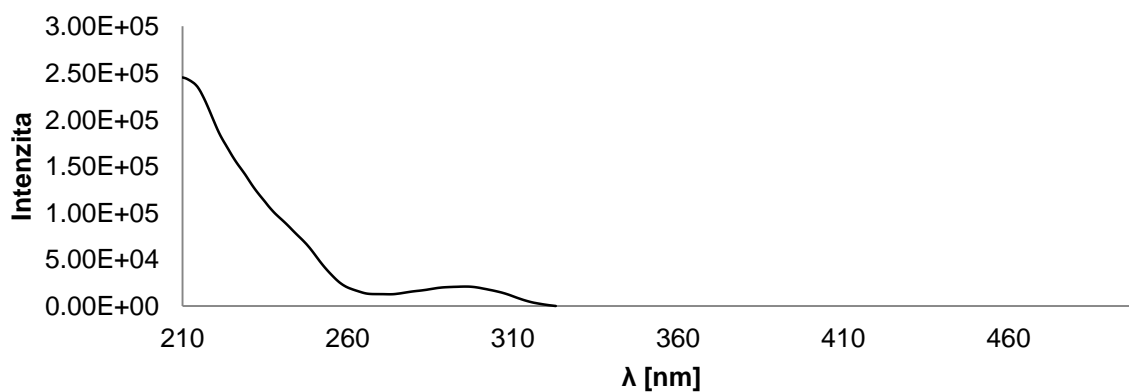


Obr. 36 Chromatogram slepého pokusu, MF I, $\lambda = 295$ nm

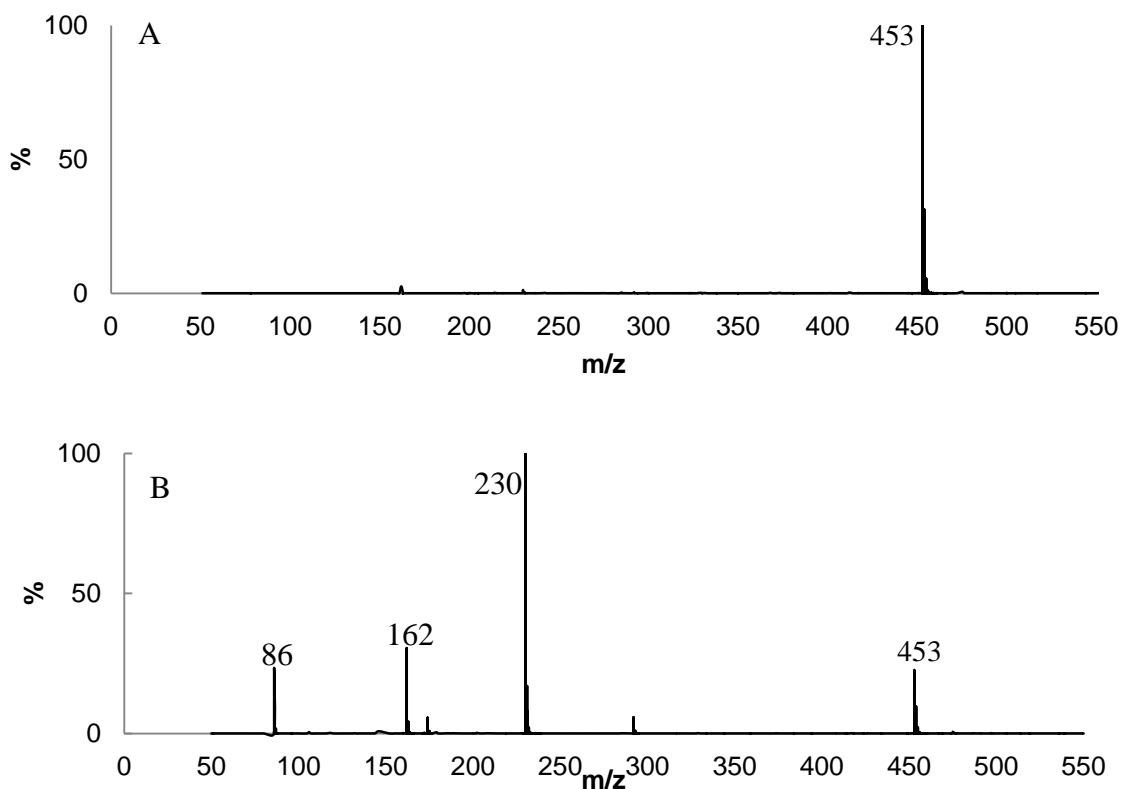


Obr. 37 Chromatogram standardu REP, MF I, $\lambda = 295$ nm

Z porovnání obou chromatogramů je patrné, že pík odpovídající REP je v čase 7,7 min. UV spektra, hmotnostní a fragmentační spektrum píku REP jsou na obrázcích 38 a 39.

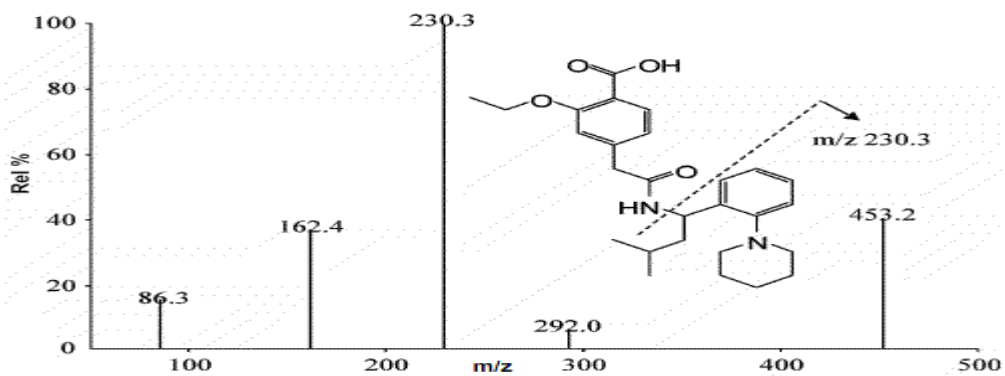


Obr. 38 UV spektrum standardu REP, MF I, $t_R = 7,69$ min

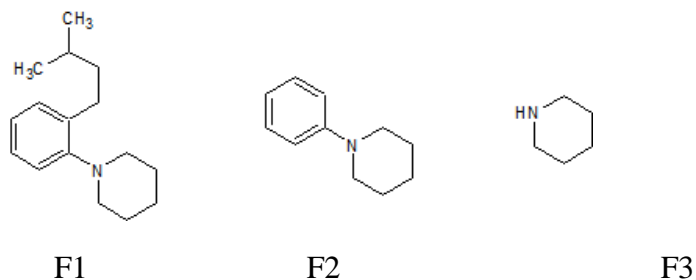


Obr. 39 Standard REP, $t_R = 7,7$ min, A - hmotnostní spektrum,
B – fragmentační spektrum, pozitivní mód ionizace

Na obrázku 40 je uvedeno hmotnostní spektrum REP spolu s jeho strukturním vzorcem a naznačenou fragmentací, jak bylo publikováno v literatuře.¹² Struktury navrhovaných fragmentů odpovídajících iontům 230, 162 a 86 jsou na obrázku 41.

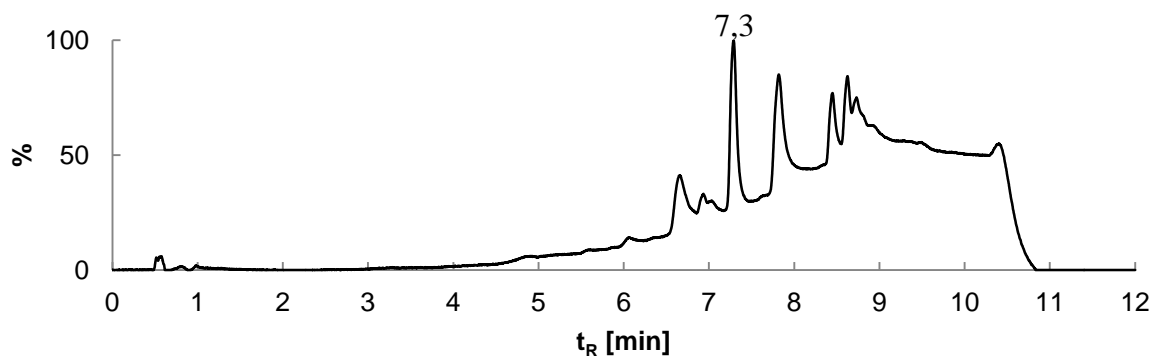


Obr. 40 Hmotnostní spektrum REP¹²

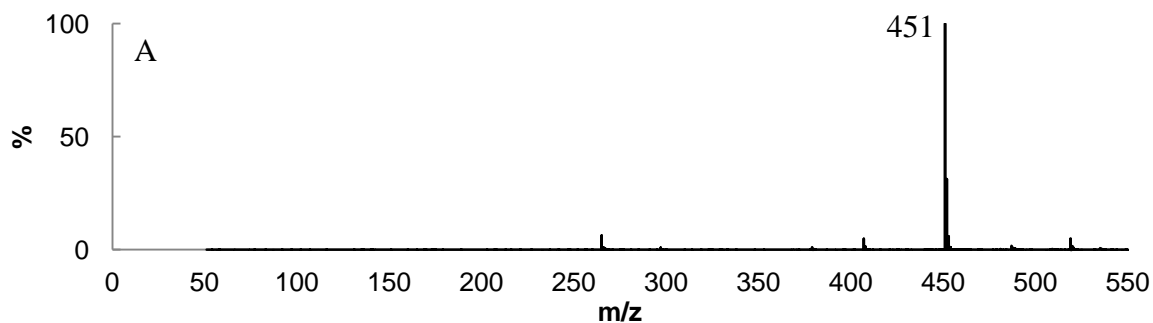


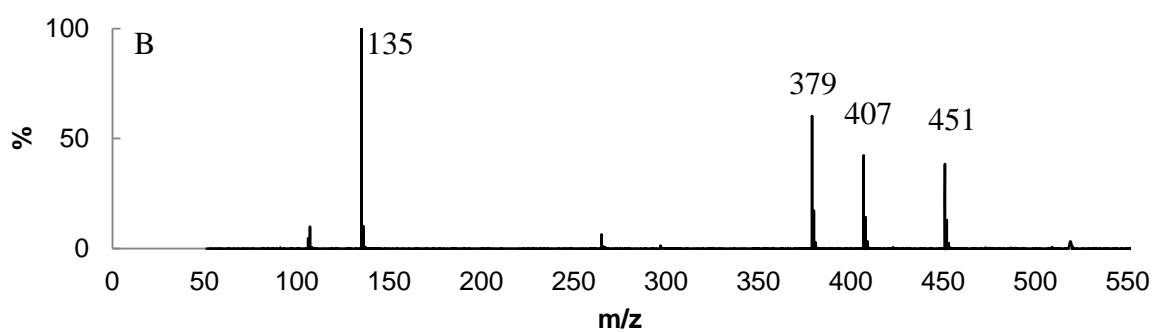
Obr. 41 Navržené struktury fragmentů REP, pozitivní ionizace

Hodnoty m/z pro jednotlivé fragmenty jsou v tabulce 5. Spektra získaná z experimentu a z literatury jsou shodná, tudíž pík čase 7,7 skutečně odpovídá REP. Chromatogram standardu REP v mobilní fázi MF II je na obrázku 42. Hmotnostní a fragmentační spektra standardu REP v negativním módu ionizace jsou na obrázku 43. HPLC separace byla provedena v mobilní fázi MF II. Struktury navrhovaných fragmentů odpovídajících iontům 407, 379 a 135 jsou na obrázku 44. Ionty produkované hmotnostním spektrometrem jsou shrnuty v tabulce 5. V mobilní fázi MF II byla retence REP 7,3 min.

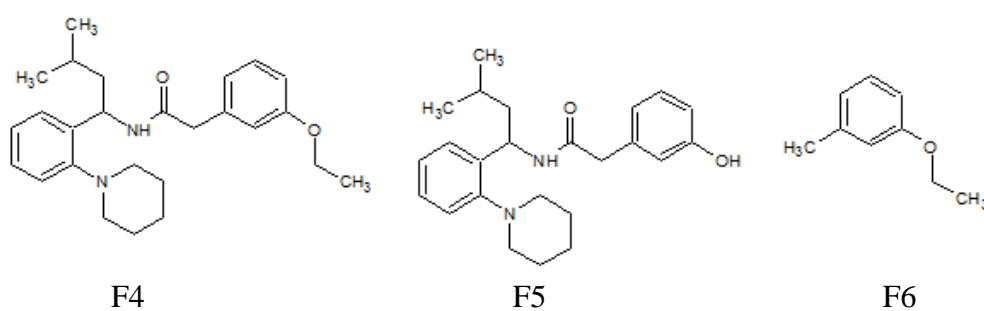


Obr. 42 Chromatogram standardu REP, MF II, $\lambda = 295$ nm





Obr. 43 Standard REP, $t_R = 7,3$ min, A - hmotnostní spektrum,
B – fragmentační spektrum, pozitivní módu ionizace



Obr. 44 Navržené struktury fragmentů REP, pozitivní ionizace

Tab. 5 Fragmentsy standardu REP

Ion	m/z		odchylka [ppm]
	pozorované	vypočtené	
[REP+H] ⁺	453,2744	453,2753	2,0
[F1+H] ⁺	230,1909	230,1909	0
[F2+H] ⁺	162,1274	162,1283	5,6
[F3+H] ⁺	86,0957	86,0970	15,1
[REP-H] ⁻	451,2592	451,2597	1,1
[F4-H] ⁻	407,2644	407,2699	13,5
[F5-H] ⁻	379,2375	379,2386	2,9
[F6-H] ⁻	135,0803	135,0810	5,2

5.8.2. MS analýza produktů elektrolýzy

Potenciostatická elektrolýza REP s následnou analýzou elektrolyzovaných roztoků metodou HPLC/MS byla provedena ve snaze indentifikovat látky vznikající jeho anodickou oxidací. Byly připraveny dvě sady roztoků smícháním 0,1 ml zásobního roztoku REP, 0,4 ml destilované vody a 0,5 ml BR pufru. První sada obsahovala BR pufr o pH 5 a druhá sada o pH 7,5. Vzorky byly elektrolyzovány při různých hodnotách potenciálu vybraných na základě průběhu cyklických voltamogramů v daném prostředí. Pro pH 5 to byly potenciály 300mV, 700 mV, 800 mV, 1000 mV a 1250 mV, pro pH 7,5 to byly potenciály 200 mV, 650 mV, 750 mV, 900 mV a 1100 mV. Skutečné hodnoty potenciálu, při kterých probíhala elektrolýza, byly měřeny externím altimetrem, který byl připojen mezi pracovní a referentní elektrodu (tab. 6). Doba elektrolýzy byla 30 minut.

Tab. 6 Skutečné hodnoty potenciálu elektrolýzy

pH 5		pH 7.5	
potenciál [mV] vs SCE			
nastaveno	změřeno	nastaveno	změřeno
700	710	650	668
800	737	750	770
1000	635	900	920
1250	750	1100	890

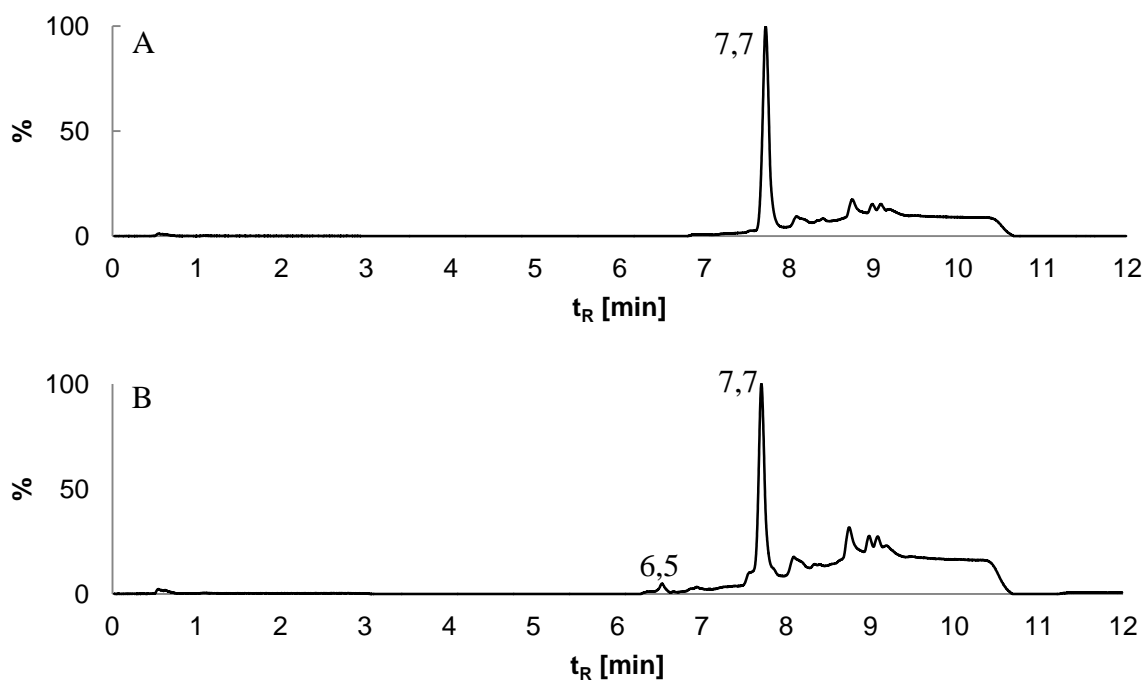
Během elektrolýzy došlo k vyloučení bílé sraženiny z roztoku. Před separací produktů byla sraženina rozpuštěna postupným přidavkem MeOH tak, že obsah MeOH byl 56 % (v/v) v roztoku s puftrem o pH 5 a 44 % (v/v) v roztoku s puftrem o pH 7,5. Vzorky, které byly elektrolyzovány při potenciálech, při kterých docházelo k oxidaci REP, zčervenaly.

Produkty elektrolýzy byly chromatograficky separovány jak v kyselé tak neutrální mobilní fázi a detekovány detektorem diodového pole (DAD) a následně analyzovány hmotnostním spektrometrem v kladném a negativním modu ionizace.

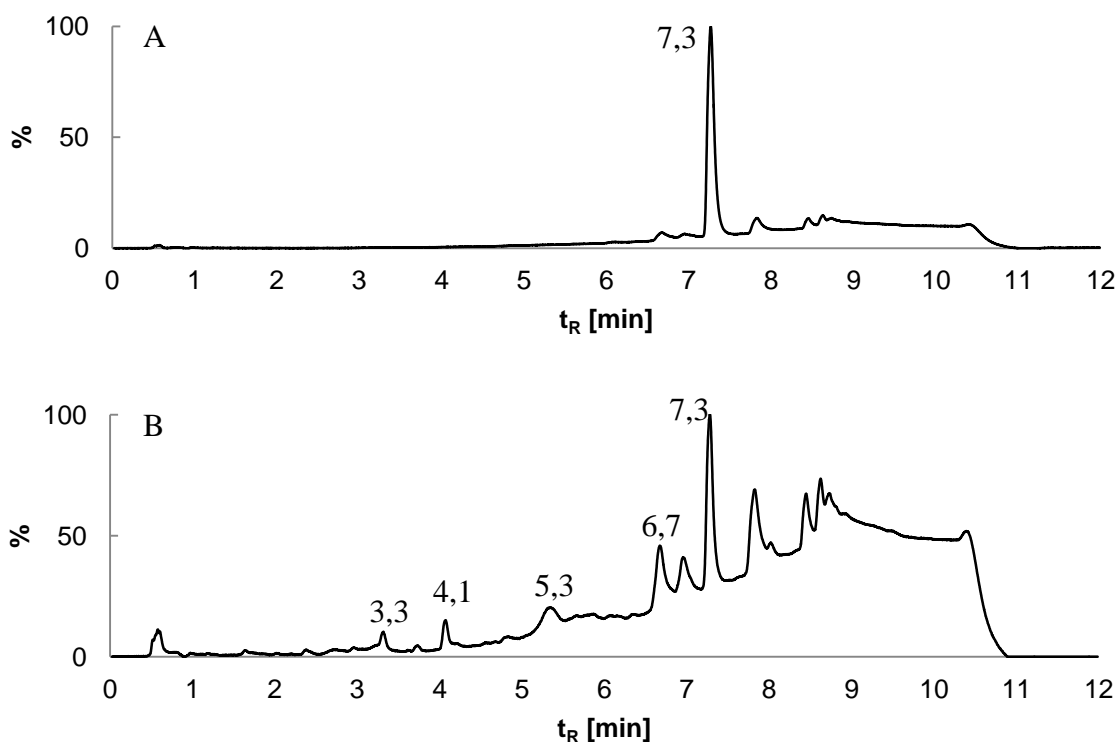
Jak již bylo zmíněno výše, pro pozitivní mód ionizace byla pro separaci použita mobilní fáze I (0,1 % kys. octová v 10 % MeOH – A, MeOH – B). V tomto nastavení vznikaly molekulové ionty $[M+H]^+$. Z analýz HPLC chromatogramů a hmotnostních spekter

pro roztoky elektrolyzované při různých hodnotách potenciálů byly navrženy strukturální vzorce produktů oxidace. Nejnižší hodnoty potenciálu elektrolyzy v obou prostředích byly zvoleny tak, aby při nich nedocházelo k oxidaci REP. Chromatogramy a spektra těchto vzorků sloužily jako srovnávací při analýze oxidačních produktů REP. Pro negativní mód ionizace byla použita mobilní fáze MF II (0,01 mol/l octan amonný – A, MeOH – B). V tomto nastavení vznikaly molekulové ionty $[M-H]^-$.

Na obrázku 42 A je chromatografický záznam vzorku REP, který byl elektrolyzován v roztoku BR pufru o pH 5 při 300 mV a na obrázku 42 B při 700 mV proti SCE a separován v mobilní fázi MF I. Na obrázku 43 A je chromatografický záznam vzorku REP, který byl elektrolyzován v roztoku BR pufru o pH 7,5 při 200 mV a na obrázku 43 B při 650 mV proti SCE a separován v mobilní fázi MF II.

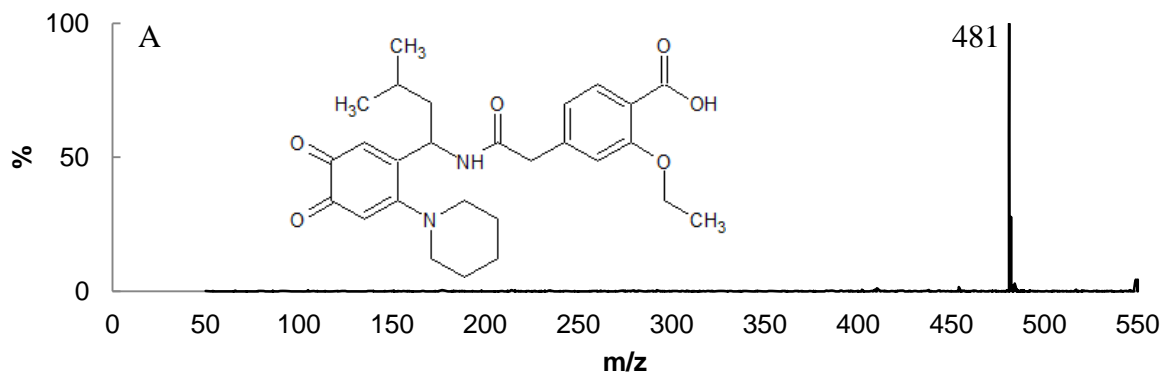


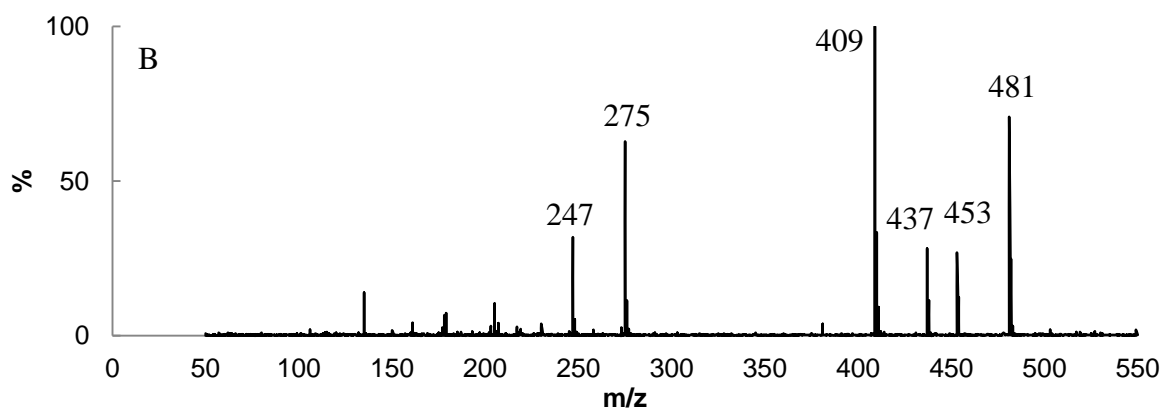
Obr. 42 Chromatografický záznam elektrolyzovaných vzorků REP, MF I, , $\lambda = 295$ nm
A – 300 mV vs SCE, B – 700 mV vs SCE



Obr. 43 Chromatografický záznam elektrolyzovaných vzorků REP, MF II, $\lambda = 295$ nm
 A – 200 mV vs SCE, B – 650 mV vs SCE

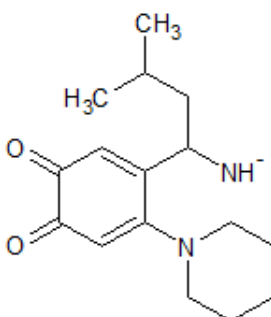
Z analýzy všech spekter byly navrženy možné oxidační produkty REP. První potenciální produkt byl nalezen ve vzorku, který byl elektrolyzován v BR pufru o pH 7,5 v retenčním čase 3,3 min v mobilní fázi MF II v negativním módu ionizace. Obrázek 44 ukazuje hmotnostní a fragmentační spektrum tohoto píku a také navrženou možnou strukturu produktu.





Obr. 44 Hmotnostní (A) a fragmentační (B) spektrum oxidačního produktu REP v BR pufru pH 7,5; 650 mV proti SCE, MF II, $t_R = 3,3$ min, negativní mód ionizace

Tento produkt byl označen jako P1. Z fragmentačního spektra byly navrženy ztráty odpovídající píkům ve spektru. Ion 453 vznikl pravděpodobně ztrátou molekuly CO z chinonové struktury, pro ion 437 je ztráta 44, což odpovídá odštěpení molekuly CO₂. Ztráta 72 pro ion 409 je fragment, který vzniká ztrátou molekuly CO a molekuly CO₂. Fragment m/z 275, označen jako P1F, vznikl pravděpodobně štěpením „peptidové vazby“. Jeho navržená struktura je na obrázku 45. Odštěpení CO z této molekuly odpovídá piku 247. Tabulka 7 dává přehled pozorovaných iontů. Vznik červeného zbarvení během elektrolýzy je další indikací, která podporuje teorii o vzniku chinonové struktury.

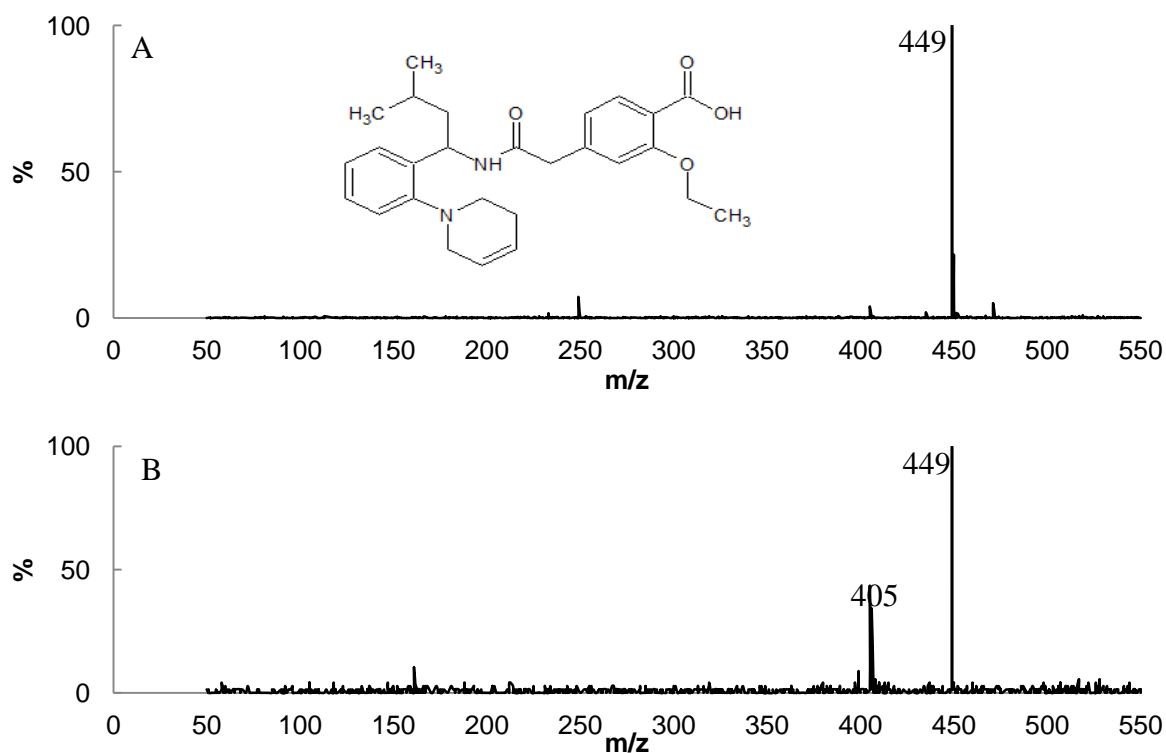


Obr. 45 Navržená struktura iontu m/z 275 (P1F)

Tab. 7 Fragменты окисаčního продукта P1, негативní ionizace

Ion	m/z		odchylka [ppm]
	pozorované	vypočtené	
[P1-H] ⁻	481,2334	481,2339	1
[P1-CO-H] ⁻	453,2389	453,2389	0
[P1-CO ₂ -H] ⁻	437,2452	437,2440	2,7
[P1-CO-CO ₂ -H] ⁻	409,2481	409,2491	9,4
[P1F-H] ⁻	275,1764	275,1760	1,5
[P1F-CO-H] ⁻	247,1830	247,1810	8,1

Druhý možný produkt byl identifikován ve vzorku REP elektrolyzovaného v BR pufru o pH 7,5 v retenčním čase 6,7 min v mobilní fázi MF II v negativním módu ionizace. Tento produkt byl označen jako P2. Hmotnostní a fragmentační spektra produktu P2 spolu s jeho navrženou strukturou jsou na obrázku 46. Tabulka 8 poskytuje přehled pozorovaných iontů.



Obr. 44 Hmotnostní (A) a fragmentační (B) spektrum oxidačního produktu REP v BR pufru pH 7,5; 650 mV proti SCE, MF II, $t_R = 6,7$ min, negativní mód ionizace

Tab. 8 Pozorované ionty produktu P2

Ion	m/z		odchylka [ppm]
	pozorované	vypočtené	
[P2-H] ⁻	449,2439	449,2440	0,2
[P2-CO ₂ -H] ⁻	405,2536	405,2542	1,5

Fragmentační pík 405 vznikl odštěpením molekuly CO₂. Poloha dvojně vazby na piperidinovém kruhu na navržené struktuře je jednou z možností. Její poloha není přesně určena. Navrhovaná struktura produktu P2 je stejná s navrhovanou strukturou *in vitro* biotransformace REP (obr. 4)

6. Závěr

Tato diplomová práce je zaměřená na studium elektrochemické oxidace léčiva repaglinidu. Cyklickou votametrií (CV) bylo zjištěno, že REP podléhá anodické oxidaci v širokém rozmezí pH a na záznamu jsou vidět dva píky. Největší proudová odezva REP je zaznamenána při pH 4,7 a zdánlivá disociační konstanta pK má hodnotu 6,13, což je v rozmezí udávané literaturou².

Při měření CV s více cykly docházelo ke značnému snížení proudové odezvy ve druhém cyklu a k mírnému snížení ve třetím cyklu. K objasnění tohoto chování byly provedeny CV při různých rychlostech skenu a také experiment, kdy se zjišťovaly adsorpční vlastnosti REP, ponořením pracovní elektrody GCE do zásobního roztoku REP a po jejím vyjmutí a opláchnutí byly změřeny cyklické voltamogramy v čistém elektrolytu. Z měření CV při různých rychlostech skenu se zjistilo, že řídicím krokem elektrodové reakce REP je difúze. Z experimentu ponoření GCE do roztoku REP se dá usuzovat na adsorpci na povrch GCE. Tato skutečnost je potvrzena tvarem kalibrační křivky REP, která je lineární pouze v oblasti nízkých koncentrací REP (do 4·10⁻⁵ mol/l) a při vyšších koncentracích limituje.

Podrobnější studium opakovaných cyklických voltamogramů zaznamenaných při různých přepínacích potenciálech ukázalo, že v prvním stupni oxidace REP vzniká elektrochemicky aktivní produkt, který se projevuje kvazireverzibilní dvojicí píků u nižších potenciálů, než je potenciál oxidace REP. Z posunu potenciálu píků při změně pH roztoku

vyplývá, že se redukce a zpětné oxidace produktu účastní protony. Oxidační produkt také projevil adsorpci na povrchu uhlíkové elektrody. Elektrochemické chování produktu tedy celkově vykazuje řadu podobností se systémy chinon/dihydroxybenzen.

HPLC/MS analýzou roztoků REP elektrolyzovaných při různých hodnotách konstantního potenciálu na platinové síťkové elektrodě při pH 5 a 7,5 byly zjištěny některé produkty anodické oxidace REP. Produkt označený P1 by patrně mohl být derivát REP s chinoidní strukturou, jehož dvě-oxoskupiny jsou pravděpodobně vázány na benzenovém jádře nesoucím piperidinový kruh. Tento produkt byl pozorován také na cyklických voltamogramech a způsoboval červené zbarvení roztoků po elektrolýze. Další produkt, označený P2, nalezený v elektrolyzovaných roztocích REP může odpovídat derivátu oxidovanému na piperidinovém kruhu. Analogický produkt byl identifikován jako jeden z metabolitů REP vnikající enzymatickou cestou s CYP3A4/2C8.

Použitá literatura

1. <http://www.novonordisk-us.com>
2. Mandic Z., Gabelica V.: *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis* **41**, (2006) 866 – 871
3. Damsbo P., Marbury C.T., Hatrop V., Clauson P., Müller G.P.: *Diabetes Research and Clinical Practise* **45** (1999) 31 – 39
4. Jirovský D., Bartošová Z., Skopalová J., Maier V.: *Journal of Chromatography B* **878** (2010) 3243 – 3248
5. Ganong FW.: *Přehled lékařské fyziologie*, H&H Jinočany 1999 s.289
6. Fuhlendorff J., Rorsman P., Kofod H., Brand L.Ch., Rolin B., MacKay P., Shymko R., Carr D.R.: *Diabetes* **47** (1998) 345 – 351
7. Farmakoterapie – profily léčiv Mudr. Kvapil
8. Bidstrup B.T., Bjørnsdottir I, Sidelmann UG, Thomsen MS, Hansen KT.: *British Journal of Clinical Pharmacology* **56** (2003) 305 – 314
9. Kajosaari L.: *Pharmacokinetics interaction affecting the antidiabetic repaglinide*. Disetační práce, Univerzita Helsinky, 2006
10. Gan J., Chen W., Shen H., Gao L., Hong Y., Tian Y., Li W., Zhang Y., Tang Y., Zhang H., Humphreys G.W., Rodrigues A.D.: *British Journal of Clinical Pharmacology* **70** (2010) 870 – 880
11. Ruzilawati B.A., Wahab A.S.M., Imran A., Ismail Z., Gan H.S.: *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis* **43** (2007) 1831 – 1835
12. Zhang J., Gao F., Guan X., Sun Y., Gu J., Fawcett P.J.: *Acta Pharmaceutical Sinica B* **1** (2011) 40 – 45
13. Cijo M.X., Basavaiah K., Abdulraham S.A.M., Vinay K.B.: *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* **17** (2011) 469 – 476
14. Gandhimathi M., Ravi K.T., Renu K.S.: *Analytical Sciences* **19** (2003) 1675 – 1677
15. Kaushal N., Jain S., Tiwary A.K.: *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **72** (2010) 240 – 244

16. Sankar D.G., Rao B.D., Latha P.V.M., Krishna M.V.: Asian Journal of Chemistry **19** (2007) 1616 - 1618
17. El-Ries A.M., Mohamed G.G., Attia K.A.: Yakugaku Zasshi **128** (2008) 171 – 177
18. Brandon F.A.E., Raap D.Ch., Meijerman I., Bijnen H.J., Schellens H.M.J.: Toxicology and Applied Pharmacology **189** (2003) 233 – 246
19. Isin M.E., Guengerich P.F.: Biochimica et Biophysica **1770** (2007) 314 – 329
20. <http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol>
21. Birkett D.J., Mckenzie I.P., Veronese E.M., Miners O.J.: Trends in Pharmacological Sciences **14** (1993) 292 – 294
22. Alabaster V.: Trends in Pharmacological Sciences **23** (2002) 13-18
23. Noury F., Mispelter J., Szeremet F., Meme S., Doan B-T.,Beloel J-C.: Magnetic Resonance Imaging **26** (2008) 1421 – 1432
24. Do T., Van Speybroeck M., Mols R., Annaert P., Martens J., Van Humbeeck J., Vermant J., Augustijns P., Van der Mooter G.: International Journal of Pharmaceutics **414** (2011) 118 – 124
25. Vetter A., Perera G., Leithner K., Klima G., Bernkop-Schnürch A.: European Journal of Pharmaceutical Sciences **41** (2010) 489 – 497
26. Šavlík M., Poláčková L., Szotáková B., Lamka J., Velík J., Skálová L: Research in Veterinary Science **83** (2007) 20 – 26
27. Lakshminarayana R., Aruna G., Sangeetha K.R., Bhaskar N., Divakar S., Baskaran V.: Free Radical Biology & Medicine **45** (2008) 982 – 993
28. Dumasia M.C.: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **40** (2006) 75 – 81
29. Lai Ch-M., Brogdon B., Quon Ch., Pieniaszek Jr. H.J.: Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis **12** (1994) 1163 – 1172
30. Matsuda M., Sakashita M., Yamaguchi T., Fujii T.: Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis **15** (1997) 1449 – 1456
31. Wielkoszyński T., Tyrpień K., Stumska M.: Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis **49** (2009) 1256 – 1260
32. He Z., Jin W.: Analytical Biochemistry **313** (2003) 34 – 40
33. van der Valk J., Brunner D., De Smet K., Fex Svenningsen A., Honegger P., Knudsen L.E., Lindl T., Noraberg J., Price A., Scarino M.L., Gstraunthaler G.: Toxicology in Vitro **24** (2010) 1053 – 1063

34. Kaku T., Ogura K., Nishiyama T., Ohnuma T., Muro K., Hiratsuka.: *Biochemical Pharmacology* **67** (2004) 2093 – 2102
35. Wheelock C.E., Wheelock A.M., Zhang R., Stock J.E., Morisseau Ch., Le Valley S.E., Green C.E., Hammock B.D.: *Analytical Biochemistry* **31** (2003) 208 – 222
36. Ogura K., Ishikawa Y., Kaku T., Nishiyama T., Ohnuma T., Muro K., Hiratsuka A.: *Biochemical Pharmacology* **71** (2006) 1358 – 1369
37. Peng F-Ch., Chang Ch-Ch., Yang Ch-Y., Edwards R.J., Doehmer J.: *Toxicology* **218** (2006) 172 – 185
38. Pilátová K.: *Metabolika*. Bakalářská práce, Masarykova Univerzita, Brno 2008
39. Gamache P.H., Meyer D.F., Granger M.C., Acworth I.N.: *Journal off the American Society of Mass Spectrometry* **15** (2004) 1717 – 1726
40. Gupta V.K., Jain R.J., Radhapyari K., Jadon N., Agarwal S.: *Analytical Biochemistry* **408** (2011) 179 – 196
41. Nesměrāk K., Doležal R., Hudská V., Bártil J., Štícha M., Waisser K.: *Electroanalysis* **22** (2010) 2117 – 2122
42. Masek A., Zaborski M. Chrzescijanska E.: *Food Chemistry* **127** (2011) 699 – 704
43. Silva M.L.S., Garcia M.B.Q., Lima J.L.F.C., Barrado E.: *Analytica Chimica Acta* **573** (2006) 383 – 390
44. Guo W., Lin H., Liu L., Song J.: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **34** (2004) 1137 – 1144
45. Lozano-Chaves M.E., Palacio-Santander J.M., Cubillana-Aguilera L.M., Naranjo-Rodriguez I., Hidalgo-Hidalgo-de-Cisneros J.L.: *Sensors and Actuators B* **115** (2006) 575 – 583
46. Shahrokhian S., Bozorgzadeh S.: *Electrochimica Acta* **51** (2006) 4271 – 4276
47. Wang L., Bai J, Huang P., Wang H., Zhang L., Zhao Y.: *Electrochemistry Communications* **8** (2006) 1035 – 1040
48. Oliveira R.T.S., Salazar-Banda G.R., Ferreire V.S., Oliviera S.C., Avaca L.A.: *Electroanalysis* **17** (2007) 1189 – 1194
49. Kotkar R.M., Srivastava A.K.: *Sensors and Actuators* **119** (2006) 524 – 530
50. Firmino de Oliveira M., Stradiotto N.R.: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **30** (2002) 279 – 284
51. Hoyer B., Jensen N.: *Electrochemistry Communications* **8** (2006) 323 – 328

52. Shahrokhian S., Fotouhi L.: *Sensors and Actuators B* **123** (2007) 942 – 949
53. Uslu B., Özkan S.A., Sentürk Z.: *Analytica Chimica Acta* **555** (341 – 347)
54. Rodríguez J., Berzas J.J., Castaneda G., Rodríguez N.: *Talanta* **62** (2002) 427 – 432
55. Wang Z., Zhang H., Zhou S., Dong W.: *Talanta* **53** (2001) 1133 – 1138
56. Wang Z., Zhang H., Zhou S.: *Talanta* **44** (1997) 621 – 626
57. Lakshmi D., Sharma P.S., Prasad B.B.: *Biosensors and Bioelectronics* **22** (2007) 3302 – 3308
58. Tyszcuk K.: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **390** (2008) 1951 – 1956
59. Lohman W., Baumann A., Karst U.: *LG/GC Europe Solutions for separation scientists* **23** (2010) 8-16
60. Baumann A., Lohmann W., Schubert B., Oberacher H., Karst U.: *Journal of Chromatography A* **1216** (2009) 3192 – 3198
61. Jahn S., Baumann A., Roscher J., Hense K., Zazzeroni R., Karst U.: *Journal of Chromatography* **1218** (2011) 9210 – 9220
62. Jirovský D., Bartošová Z., Skopalová J.: *Acta Universitatis Palackianae Olomouensis, Chemica* **47** (2007) 22 – 25
63. Lohmann W., Dötze R., Gütter G., Van Leeuwen S.M., Karst U.: *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **20** (2009) 138 – 145
64. Davey N.G., Krogh E.T., Gill Ch.G.: *Trends in Analytical Chemistry* **30** (2011) 1477 – 1485
65. Baltruschat H.: *Journal of American Society for Mass Spectrometry* **15** (2004) 1693 – 1706
66. Vaškelis A., Jusys Z.: *Analytica Chimica Acta* **305** (1995) 227 – 231
67. Odijk M., Baumann A., Olthuis W., van der Berg A., Karst U.: *Biosensors and Bioelectronics* **26** (2010) 1521 – 1527
68. Hayen H., Karst U.: *Journal of Chromatography A* **1000** (2003) 549 – 565
69. Van Leeuwen S.M., Blankert B., Kauffmann J-M., Karst U.: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **382** (2005) 752 – 750
70. Lohmann W., Karst U.: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **386** (2006) 1701 – 1708
71. Lohmann W., Karst U.: *Analytical Chemistry* **79** (2007) 6831 – 6839

72. Amatore C.: *Organic Electrochemistry*, (Lund H., Hammerich O., ed.), kap. 1. Marcel Dekker, čtvrté vydání, New York 2001.
73. Gosser D.K. Jr.: *Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanism*, VCH Publishers, New York (1993)