

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra fyzikální chemie



**EXTRAKČNÍ VOLTAMETRIE A JEJÍ VYUŽITÍ  
V ANALÝZE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK**

**Bakalářská práce**

Autor práce:

Nikola Mikulová

Vedoucí práce:

RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

Studijní program:

Chemie

Studijní obor:

Aplikovaná chemie

Forma studia:

Prezenční

Olomouc 2019

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a další zdroje informací jsou řádně uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne .....

.....

Podpis

Tímto bych ráda poděkovala RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. za odborné vedení, připomínky, cenné rady, ale především za trpělivost a ochotu při vypracování této bakalářské práce. V neposlední řadě chci také poděkovat svým rodičům za podporu a vedení během celého studia.

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora: Nikola Mikulová  
Název práce: Extrakční voltametrie a její využití v analýze biologicky aktivních látek  
Typ práce: Bakalářská  
Pracoviště: Katedra analytické chemie  
Vedoucí práce: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.  
Rok odevzdání práce: 2019

### **Anotace:**

Tato bakalářská práce se zabývá přípravou fosfolipidové vrstvy na povrchu elektrody ze skelného uhlíku, jako modelu jednoduché biomimetické membrány. Celistvost a stabilita připravené asolectinové vrstvy byla sledována pomocí cyklické voltametrie a elektrochemické impedanční spektroskopie. Elektroda modifikovaná fosfolipidovou vrstvou byla testována pro měření metodou extrakční voltametrie na dvou vybraných biologicky aktivních látkách ze skupiny antimuskarinových léčiv - tolterodinu a fesoterodinu. Na rozdíl od tolterodinu, jehož oxidací vznikaly produkty pasivující elektrodový povrch a znemožňující analytické využití modifikované elektrody, fesoterodin extrahovaný do asolectinové vrstvy poskytoval analyticky využitelný proudový signál rostoucí s koncentrací léčiva ve vzorku. Metoda extrakční diferenční pulsní voltametrie s asolectinem modifikovanou elektrodou byla aplikována na analýzu fesoterodinu v modelovém vzorku moči.

Klíčová slova: asolectin, tolterodin, fesoterodin, fosfolipidy, voltametrie  
Počet stran: 60  
Počet příloh: 7  
Jazyk: Český

## **Bibliographical identification**

Author: Nikola Mikulová  
Title: Extraction voltammetry and its application in analysis of biologically active compounds  
Type of thesis: Bachelor  
Department: Department of Analytical Chemistry  
Supervisor: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.  
The year of submission: 2019  
Annotation:

This bachelor thesis deals with the preparation of a phospholipid layer, as a model of a simple biomimetic membrane, on the surface of a glassy carbon electrode. The integrity and stability of the prepared asolectin layer was proved by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. The phospholipid layer-modified electrode was tested on the measurement using extraction voltammetry. Two biologically active substances from the group of antimuscarinic drugs - tolterodine and fesoterodine - were selected for the purpose. Unlike tolterodine, oxidation products of which passivates the electrode surface and does not allow analytical utilization of the modified electrode, fesoterodine extracted into the asolectin layer provided an analytically useful current signal increasing with drug concentration in the sample. Extractive differential pulse voltammetry with asolectin-modified electrode was applied to the analysis of fesoterodine in a model urine sample.

Keywords: asolectin, tolterodine, fesoterodine, phospholipids, voltammetry  
Number of pages: 60  
Number of appendices: 7  
Language: Czech

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1. Charakterizace biologických membrán</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2. Modely fosfolipidových membrán</b> .....	<b>10</b>
2.2.1. Planární fosfolipidové dvojvrstvy.....	11
2.2.2. Stabilizované fosfolipidové dvojvrstvy .....	14
2.2.3. Ukotvené fosfolipidové dvojvrstvy .....	15
2.2.4. Liposomy .....	16
<b>2.3. Studované látky</b> .....	<b>18</b>
2.3.1. Tolterodin .....	18
2.3.2. Fesoterodin .....	22
<b>2.4. Použité elektrochemické metody</b> .....	<b>26</b>
2.4.1. Voltametrie .....	26
2.4.1.1. Extrakční voltametrie.....	26
2.4.1.2. Cyklická voltametrie.....	27
2.4.1.3. Diferenční pulsní voltametrie.....	28
2.4.2. Elektrochemická impedanční spektroskopie .....	29
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1. Přístrojové vybavení</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2. Chemikálie</b> .....	<b>31</b>
<b>3.3. Příprava roztoků</b> .....	<b>32</b>
<b>3.4. Použité pracovní postupy</b> .....	<b>32</b>
3.4.1. Čištění nepokryté elektrody .....	32
3.4.2. Modifikace pracovní elektrody vrstvou fosfolipidů .....	32
3.4.3. Čištění GCE od vrstvy fosfolipidů .....	33
3.4.4. Kontrola čistoty GCE a celistvosti modelové membrány .....	33
3.4.5. Stabilita modelové membrány .....	34
3.4.6. Akumulace analytu .....	34
3.4.7. Interakce asolectinu a antimuskarinik .....	35
3.4.8. Kalibrační závislosti TOL a FES.....	36
3.4.9. Stanovení FES ve vzorku moči.....	36
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1. Kontrola čistoty GCE a celistvosti modelové membrány</b> .....	<b>37</b>
4.1.1. Cyklická voltametrie.....	37

4.1.2. Elektrochemická impedanční spektroskopie .....	38
<b>4.2. Stabilita modelové membrány .....</b>	<b>39</b>
<b>4.3. Akumulace analytu .....</b>	<b>43</b>
4.3.1. Tolterodin .....	43
4.3.2. Fesoterodin .....	43
<b>4.4. Interakce asolectinu a antimuskarinik.....</b>	<b>45</b>
4.4.1. Tolterodin .....	45
4.4.2. Fesoterodin .....	46
<b>4.5. Kalibrační závislosti.....</b>	<b>47</b>
4.5.1. Tolterodin .....	47
4.5.2. Fesoterodin .....	48
<b>4.6. Stanovení FES ve vzorku moči .....</b>	<b>52</b>
<b>5. ZÁVĚR .....</b>	<b>53</b>
<b>6. SUMMARY .....</b>	<b>54</b>
<b>SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>55</b>
<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>61</b>

# 1. Úvod

Extrakční voltametrie je elektrochemická metoda, při které se poměr signál/šum zlepšuje prekoncentrací analytu na elektrodě před samotným měřením. Oproti obvyklé adsorpční rozpouštěcí voltametii zde dochází k adsorpci/extrakci analytu bez využití vnějšího potenciálu. K tomu je potřeba elektrody z vhodného materiálu, do kterého se daná látka bude snadno extrahovat. Vhodná je uhlíková pastová elektroda, tvořená uhlíkovým práškem a parafinovým či silikonovým olejem. Při stanovení biologicky aktivních látek je také možné extrahovat látky modifikací elektrody (např. GCE) fosfolipidovou membránou, která simuluje reálnou biologickou membránu.

Z důvodu složité struktury biologických membrán jsou pro výzkum využívány modelové fosfolipidové dvojvrstvy, které jsou sice ve srovnání s reálnou biologickou membránou velmi zjednodušené, ale mají stejné fyzikální vlastnosti, což umožňuje studovat tyto vlastnosti. Tyto modelové membrány se skládají z molekul fosfolipidů, které mají amfifilní charakter. Obsahují tedy jak polární část (tzv. hlavu), tak nepolární část - uhlovodíkový řetězec (tzv. ocas). Tyto amfifilní části molekuly mají zásadní roli při uspořádání fosfolipidů ve vodném prostředí do dvojných vrstev, kdy hydrofilní hlavy jsou orientovány směrem do vodného prostředí, zatímco hydrofobní konce fosfolipidů směřují do vnitřní části membrány. Toto uspořádání je energeticky nejvýhodnější a vyhovuje tak všem částem molekuly. Modelové membrány jsou využívány pro řadu důležitých studií. Mezi nejdůležitější patří i studium interakce fosfolipidových membrán s biologicky aktivními látkami. Mezi biologicky aktivní látky patří například antimuskarinika. Tato skupina léčiv slouží především k léčbě urgentní inkontinence pacientů a léčbě nykturie. Antimuskarinikum blokuje muskarinové receptory a dochází tak k uvolnění svaloviny močového měchýře a zadržení většího množství moči. V této bakalářské práci je pozornost věnována konkrétně tolterodinu a fesoterodinu.

Cílem této bakalářské práce je sledování interakcí vybraných antimuskarinových léčiv s modelovou biologickou membránou připravenou ze směsi přírodních fosfolipidů na povrchu elektrody ze skelného uhlíku. Asolectin použitý k tvorbě vrstvy je směs fosfolipidů izolovaná ze sójových bobů a dokáže tak lépe napodobit přirozené vlastnosti reálných biomembrán. Fosfolipidová membrána je v této práci použita pro extrakci lipofilních léčiv a jejich prekoncentraci na povrchu elektrody s perspektivou využít tento postup pro voltametrické stanovení léčiv v biologických vzorcích.



## 2. Teoretická část

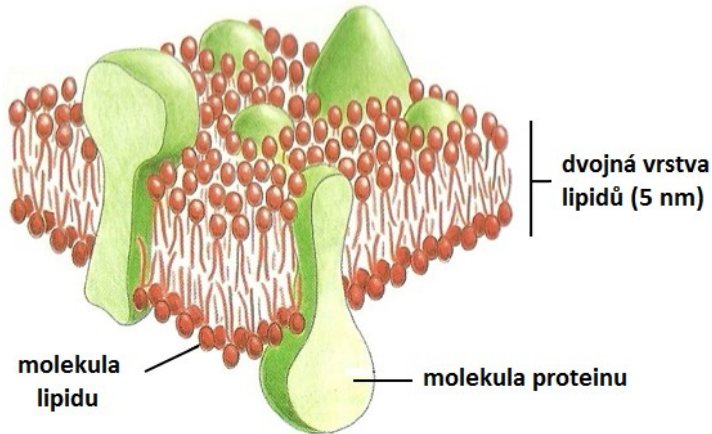
### 2.1. Charakterizace biologických membrán

Každá živá buňka je samoreprodukční soustava tvořená cytoplazmou uzavřenou uvnitř obalu. Tímto obalem a zároveň jednou z nejdůležitějších částí buňky je plasmatická membrána. Zjednodušeně jde o velmi tenkou (přibližně 5 nm) a průsvitnou vrstvu lipidových molekul

Základní a nejdůležitější funkcí buněčné membrány je ochrana buňky před jejím okolím. V tomto případě slouží membrána jako bariéra, která zabraňuje úniku obsahu buňky a jeho následnému smíchání s okolním médiem. Další důležitou funkcí je transport živin z vnějšího prostředí buňky do vnitřního a zároveň transport odpadních látek z vnitřního prostředí do vnějšího. Tyto transportní procesy jsou zabezpečovány selektivními kanály a pumpami, které jsou tvořeny molekulami proteinů. Membrána má také výborné mechanické vlastnosti. V případě růstu nebo změny tvaru buňky dochází také zároveň k růstu či deformaci membrány samotné, a to bez sebemenšího poškození [1, 2].

Buněčná membrána je tvořena především z proteinů (přibližně 55 %) a fosfolipidů (asi 25 %). Dále pak obsahuje cholesterol (13 %), malé množství ostatních lipidů a sacharidů. Velké množství membránových proteinů přispívá zejména k tvorbě celkové struktury membrány. Důležité jsou zde především již zmíněné póry a kanály, které zprostředkovávají transport živin [1].

Základní stavební složkou každé biologické membrány jsou dvojně vrstvy tzv. fosfolipidové dvojvrstvy (Obr. 1). Molekuly fosfolipidů jsou v těchto dvojvrstvách amfipatické, což znamená, že obsahují jak polární, tak nepolární část. Polární částí je u fosfolipidů hydrofilní skupina tzv. hlava. Ta obsahuje jak záporně nabitou fosfátovou skupinu, tak i jiné polární skupiny jako např. cholin nebo ethanolamin, které umožňují tvorbu vazeb nebo vodíkových můstků s molekulami vody [2, 3]. Nepolární částí je zde hydrofobní uhlovodíkový řetězec tzv. ocas, který se skládá z uhlovodíkových řetězců mastných kyselin [1]. Tyto řetězce obsahují obvykle sudý počet atomů uhlíků (nejčastěji 16 nebo 18) [3]. Amfifilní části molekuly mají zásadní roli při uspořádání fosfolipidů ve vodném prostředí do dvojných vrstev, kdy hydrofilní hlavy jsou orientovány směrem do vodného prostředí, zatímco hydrofobní konce fosfolipidů směřují do vnitřní části membrány. Takovéto uspořádání je energeticky nejvýhodnější. [2, 4]



Obr. 1 - Schématický popis buněčné membrány [2]

Vodné prostředí uvnitř i vně buňky udržuje lipidy ve dvojvrstvě. Ty se mohou v rámci dvojvrstvy pohybovat a vyměňovat si tak vzájemně svá místa. Z tohoto důvodu se membrána chová jako dvourozměrná tekutina a lze tak říci, že má polotekutý charakter. Míra tekutosti (fluidity) je dána především délkou a stupněm nenasycenosti uhlovodíkových řetězců. Platí, že čím těsněji a pravidelněji se může řetězec sbalit, tím méně tekutá bude membrána [2]. Na fluiditu membrány má vliv také cholesterol, který je obsažen v mezerách mezi sousedními fosfolipidy a omezuje tak jejich pohyb. Tím dochází ke snížení fluidity a ke zpevnění membrány, která je pak méně propustná [5]. Dále může být tekutost membrány ovlivněna například teplotou, iontovou silou, tlakem a typem mastných kyselin [6].

## 2.2. Modely fosfolipidových membrán

Z důvodu složité struktury biologických membrán jsou v současné době pro výzkum velice často využívány modelové fosfolipidové membrány. Ačkoli jde o velmi zjednodušenou formu reálných buněčných membrán, mají modelové lipidové dvojvrstvy stejné fyzikální vlastnosti, což umožňuje studium těchto jejich vlastností a funkcí, a to i přes absenci transportních proteinů, iontových kanálků a dalších struktur, které reálné membrány obsahují. Nejjednodušeji tvořená modelová dvojvrstva může obsahovat pouze jeden typ uměle vyrobeného fosfolipidu nebo směs uměle připravených a přírodních lipidů [4, 1]. Směsí takovýchto přírodních lipidů je například asolectin extrahovaný ze sójových bobů, jehož nejpodstatnější složkou je fosfatidylcholin [7].

Modelové membrány se vyznačují řadou výhod a příznivých vlastností při studiích. Mezi tyto výhody patří například možnost obměňovat obsah lipidů v dané membráně.

Tato skutečnost umožňuje studium vlivu různého složení lipidů na funkci membrány. Dalšími výhodami je možnost začlenit do vezikul membránové proteiny nebo enzymy, řídit a měnit prostředí daných systémů, ale především schopnost při tvorbě liposomů začlenit do jejich vnitřní struktury například léčivo nebo izolované geny. Takto lze dané léčivo dopravit pomocí liposomů do přesně cílených tkání nebo nádorů, kde dojde k uvolnění účinné látky [3, 8].

V závislosti na typu studia vlastností membrán lze různými technikami připravit rozdílné typy modelových dvojvrstev – planární a stabilizované fosfolipidové dvojvrstvy, ukotvené lipidové dvojvrstvy a liposomy. Kupříkladu planární fosfolipidové dvojvrstvy se využívají především pro studium složení a permeability membrány, kdežto stabilizované fosfolipidové dvojvrstvy se využívají zejména pro testování mechanických vlastností [1].

Metod využívaných pro studium membrán je mnoho a lze je rozdělit do několika skupin. Hojně využívaná je skupina spektrálních metod, která zahrnuje například infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací (FTIR), Ramanovu spektroskopii [9], NMR [10] nebo UV/VIS spektroskopii [11]. Využívané jsou také elektrochemické metody, zejména pak elektrochemická impedanční spektroskopie a různé druhy voltametrie [12]. Nejvýznamnějšími metodami pro výzkum membrán jsou však především mikroskopie atomárních sil (AFM) a fluorescenční mikroskopie [13].

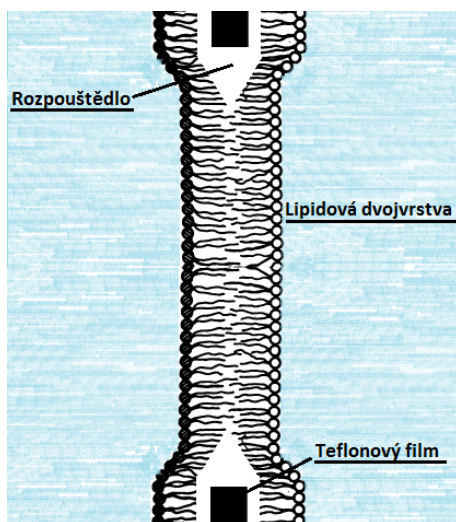
Modelové membrány mají také velkou škálu využití. Nejvýznamnějším a nejdůležitějším je využití modelových membrán jako základu pro konstrukci velice citlivých biosenzorů. Neméně důležité je jejich využití při sledování vzájemného působení léčivých látek a buněčných membrán, které je velice důležité při vývoji nových léčiv. Využívané jsou také pro studium kinetického chování iontových kanálků a v neurověděch při sledování tvorby funkčních synapsí [14].

### **2.2.1. Planární fosfolipidové dvojvrstvy**

Planární fosfolipidová dvojvrstva je jedním z nejjednodušších, a zároveň nejvíce užitečných modelů buněčné membrány. Protože tento model umožňuje přístup k roztoku a současně elektrickou kontrolu obou stran dvojvrstvy, čímž napodobuje skutečné fyziologické podmínky, je tento modelový systém velmi podobný reálné buněčné membráně. Planární fosfolipidové dvojvrstvy jsou také často označovány jako černé lipidové membrány (z angl. black lipid membranes = BLM's). Příčinou tohoto označení je optické chování těchto dvojvrstev při jejich formování, kdy se pod mikroskopem jeví

jako černé nebo šedé tečky, což je zapříčiněno jejich tloušťkou, která je pouze několik nanometrů. Planární fosfolipidové dvojvrstvy jako první vyvinul a popsal Mueller v druhé polovině 20. století. [15, 16]

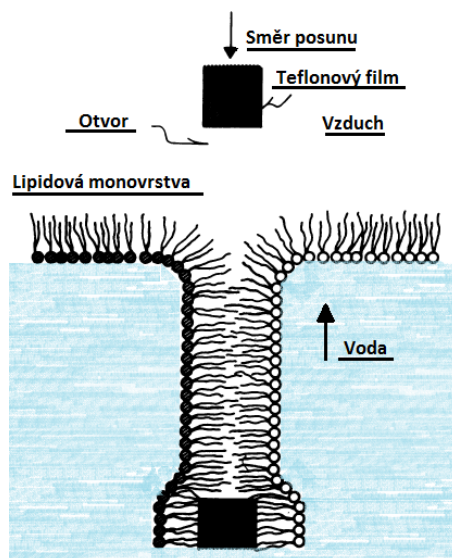
Existuje několik způsobů přípravy toho typu modelových membrán. První z těchto metod je metoda natírací (z angl. „painting“) vyvinutá Muellerem, Rudinem, Tienem a Wescottem. Zároveň jde také o nejstarší techniku přípravy BLM's [17]. Principem metody je nanesení malého množství lipidového roztoku, rozpuštěného obvykle v organickém rozpouštědle, kterým je například dekan, do velmi malého otvoru v přepážce (přibližně 50-500  $\mu\text{m}$ ), která odděluje dvě nádoby s vodnými roztoky. Takováto přepážka je vyrobena nejčastěji z hydrofobního materiálu, teflonu, a nanesení lze provést obyčejným štětcem [18, 19]. Po přechodu roztoku lipidů přes otvor v přepážce dojde k odvedení většiny rozpouštědla a následně ke spontánní tvorbě lipidové dvojvrstvy ve středu tohoto otvoru. Nevýhodou metody je usazení molekul rozpouštědla na okraji otvoru. Tyto molekuly zásadně ovlivňují vlastnosti vzniklé membrány. V místě výskytu molekuly rozpouštědla také nedochází k tvorbě lipidové dvojvrstvy, protože monovrstvy zde nemají možnost splynout. Schéma přípravy BLM's natírací metodou znázorňuje obr. 2. [18, 20]



Obr. 2 - Znázornění přípravy BLM's natírací metodou

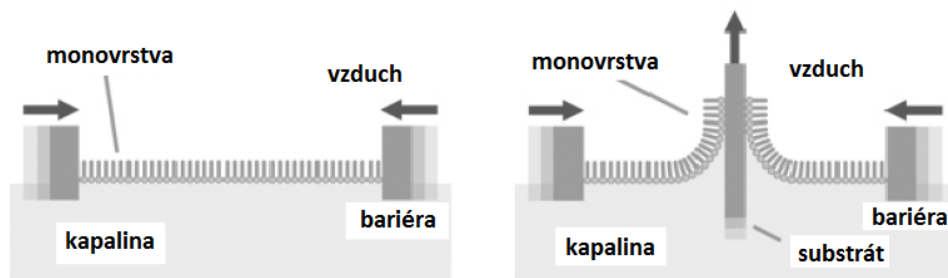
Druhou technikou přípravy modelových planárních membrán je skládací metoda (z angl. „folding“), která byla původně popsána Takagim a poté upravena Montalem a Muellerem [21]. Tato technika byla vyvinuta za účelem odstranit nedostatky natírací metody, a to především odstranit z nově vzniklých membrán molekuly rozpouštědla.

Hlavní myšlenkou Montala a Muellera bylo, že planární lipidové dvojvrstvy jsou vlastně složením lipidových monovrstev, které mohou být snadno vytvořeny na rozhraní vzduch-voda a zkoumány například na tenkých fóliích. Při skládací metodě se tedy opět využívají dvě nádoby s vodným roztokem, mezi kterými je umístěná tenká fólie, opět nejčastěji vyrobená z teflonu. V teflonové přepážce je, stejně jako při natírací metodě, otvor, který ale v tomto případě není ve styku s vodnými roztoky. Monovrstvy lipidů na obou hladinách jsou vytvořeny nanášením roztoku lipidů. Při tomto kroku je důležité použít vysoce těkavá rozpouštědla, jako například pentan nebo hexan, aby došlo k rychlému odpaření a následnému snížení obsahu rozpouštědla v lipidové fázi. Po odpaření rozpouštědla, které obvykle trvá 5-15 minut, se opatrně zvednou hladiny v nádobách a dojde tak ke spojení obou monovrstev přes otvor mechanismem podobným zipu [22]. Schéma přípravy BLM's skládací metodou znázorňuje obr. 3.



Obr. 3 - Znárodnění přípravy BLM's skládací metodou [23]

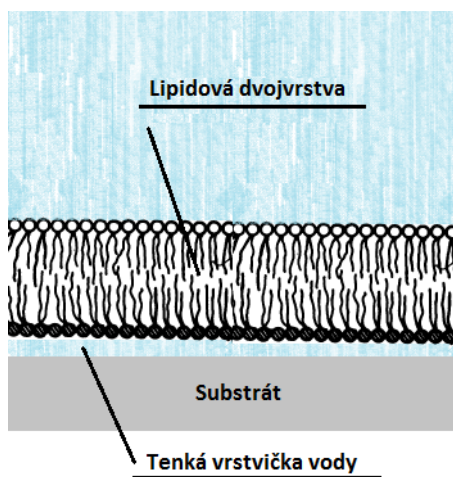
Další metodou přípravy BLM's je technika podle Langmuira a Blodgettové. Opět jde o metodu vytváření modelových membrán, které neobsahují molekuly rozpouštědla. Nejdříve je na hladině vody vytvořena monovrstva nanášením roztoku daných fosfolipidů. Tato vrstva je poté stlačována pohyblivou bariérou, umístěnou na straně nádoby. Tím dochází k eliminaci mezer mezi jednotlivými molekulami fosfolipidů. Do středu vodní hladiny je poté vsunut substrát, na který se následně naváže připravená monovrstva lipidů. Takto dochází k tvorbě ultratenkého lipidového filmu, jenž má jednotnou tloušťku a určitou strukturu [1]. Schéma přípravy BLM's metodou Langmuira a Blodgettové znázorňuje obr. 4.



Obr. 4 - Schématické znázornění přípravy BLM's metodou Langmuira a Blodgettové [1]

### 2.2.2. Stabilizované fosfolipidové dvojvrstvy

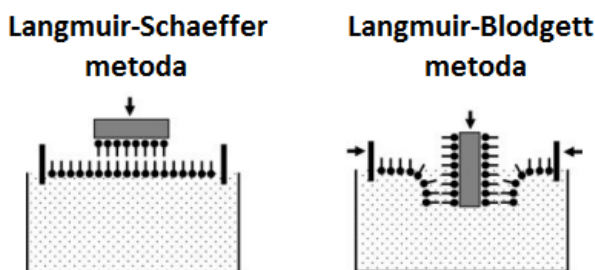
Stabilizované fosfolipidové dvojvrstvy (z angl. supported phospholipid bilayers = s-PLB) (Obr. 5) patří mezi hojně využívané modelové membrány, jež poprvé popsal McConnell v roce 1985 [24]. Tento typ modelové dvojvrstvy je realizován nanesením planární struktury membrány na pevný nosič (substrát). Tu však od substrátu odděluje velmi tenká vrstva vody, která rovněž udržuje tekutost dané membrány. Vrchní část membrány je vystavena roztoku. Jako nejlepší a zároveň nejběžnější materiály pro přípravu s-PLB jsou využívány především slída, oxid křemičitý a borosilikátové sklo. Při použití těchto substrátů, které se vyznačují vlastnostmi jako hydrofilita, hladkost a čistota povrchu, dochází k tvorbě velice kvalitních membrán [1, 25].



Obr. 5 - Stabilizovaná fosfolipidová dvojvrstva [1]

Existuje hned několik metod pro přípravu s-PLB. Mezi nejvýznamnější a zároveň nejvíce používané techniky přípravy patří metoda splynutí váčků a metoda Langmuir-Blodgett/Langmuir-Schaefer (LB/LS) (Obr. 6). Principem LB/LS metody je spojení dvou Langmuierových filmů neboli monovrstev lipidů. Jedna z monovrstev je vytvořena nanesením roztoku lipidů na pevný substrát a druhá je k ní poté připojena

bud' vertikálně metodou Langmuir-Blodgett nebo vodorovně metodou Langmuir-Schaefer, za vzniku lipidové dvojvrstvy na tomto substrátu. Výhodou metody LB/LS je především schopnost kontroly pevnosti vrstev a možnost tvorby membrán, skládajících se ze dvou odlišných lipidových monovrstev [4, 26].



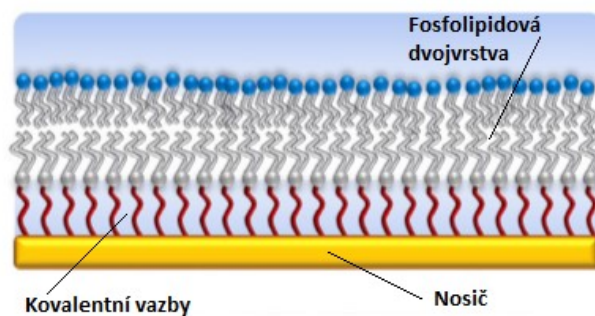
Obr. 6 - Příprava s-PLB metodou LB/LS [26]

Druhou již zmíněnou technikou je metoda splynutí váčků. Při této metodě je zapotřebí vytvořit velmi malé, unilamelární vezikuly s velikostí mezi 30 a 50 nm, a to buď extruzí přes porézní filtr nebo sonikací. Ve vodném prostředí poté dochází k samovolné adsorpci těchto vezikul na povrch substrátu, kde se následně akumulují, propojují a deformují, dokud nedojde k jejich prasknutí a následnému srovnání do roviny, čímž vzniká rovinná lipidová dvojvrstva [26].

Stabilizované fosfolipidové dvojvrstvy mají velké množství výhod. Jejich největší výhodou je především jejich stabilita, a to i vůči vibracím a velkým průtokovým rychlostem. Další neméně důležitou výhodou je možnost charakterizace pomocí různých nástrojů, zejména díky jejich přístupnému povrchu. Nevýhodou je poté nežádoucí interakce se substrátem, kdy zásadní roli hraje jeho hydrofilnost [1].

### 2.2.3. Ukotvené fosfolipidové dvojvrstvy

Ukotvené lipidové dvojvrstvy (z angl. tethered bilayer lipid membranes = t-BLM's) (Obr. 7), jenž byly vyvinuty Langmuirem, jsou založeny na ukotvení planární struktury fosfolipidové dvojvrstvy na pevném substrátu (nosiči). Vnitřní strana fosfolipidové dvojvrstvy je s nosičem spojena kovalentní vazbou pomocí tzv. „spacer skupiny“. Touto skupinou je většinou krátký oligomer a kotevní lipid, jenž může vázat substrát chemickou vazbou. Spacer skupina obsahuje ve svém povrchu drobné nedokonalosti, které umožňují ukládání vody a iontů pod membránou. Jako nosič se nejčastěji využívá zejména zlato pro jeho stabilitu, ale je také možné využít například oxid hlinitý, oxid křemičitý nebo rtuť [27, 28].



Obr. 7 - Struktura t-BLM's [27]

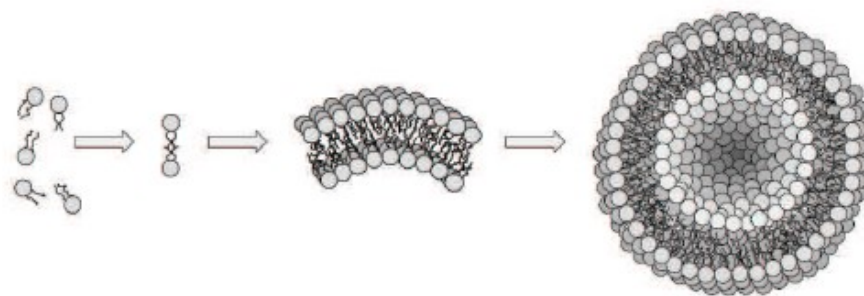
Původně využívaná metoda Langmuira a Blodgettové pro přípravu t-BLM's je v současné době již nahrazena metodami, při kterých dochází k samouspořádání vrstev lipidů, a to zejména pro jejich vysokou reprodukovatelnost a technickou jednoduchost [1]. Mezi substrátem a fosfolipidovou dvojvrstvou se vyskytuje velmi malý prázdný prostor, který poskytuje místo pro uložení transmembránových proteinů, iontů a drobných molekul [29].

t-BLM's jsou velice často využívány kvůli vysoké stabilitě, snadné přípravě, a především kvůli možnosti jejich charakterizace velkými množstvími analytických spektroskopických a elektrochemických metod jako jsou například elipsometrie, infračervená spektroskopie, elektrochemická impedanční spektroskopie nebo cyklická voltametrie. Ukotvené modelové membrány hrají velice důležitou roli například při farmaceutických studiích Alzheimerovy nemoci, HIV, účinků oxidačního poškození buněčné membrány atd. Tyto membrány mohou také napodobit strukturu vnější membrány bakterií, jež mohou způsobit velice nebezpečnou infekci odolnou vůči většímu množství léků [27].

#### 2.2.4. Liposomy

Liposomy jsou uměle připravené sférické vezikuly, jinými slovy též váčky, jejichž velikost je přibližně 20 nm až několik μm. Tyto vezikuly vznikají shlukováním amfifilních molekul fosfolipidů do dvojvrstev v důsledku zvyšování koncentrace těchto molekul ve vodném prostředí [30, 31]. Schéma tvorby liposomu lze vidět na obr. 8. Lipidy jsou ve dvojných vrstvách liposomů uspořádány tak, aby hydrofilní polární hlavy směřovaly do vnitřní dutiny liposomu a do jeho extravezikulárního prostředí. Hydrofobní uhlovodíkové řetězce neboli ocasy směřují směrem k sobě [1]. Vnitřní dutinu lze také nazvat centrálním jádrem, které je tvořené vodnou fází a lze sem začlenit také další hydrofilní látky, což má obrovský význam zejména v oblasti farmacie a medicíny [31, 32].





*Obr. 8 - Schématické zobrazení tvorby liposomu [32]*

Liposomy se nejčastěji dělí podle velikosti a počtu fosfolipidových dvojvrstev neboli lamel, které je tvoří. Nejjednodušší a nejčastěji využívané liposomy tvořené pouze jednou fosfolipidovou membránou se nazývají unilamelární vezikuly. Lze je dělit na malé unilamelární vezikuly (SUV) s velikostí od 20 do 100 nm, velké unilamelární vezikuly (LUV) s velikostí od 100 do 1 000 nm a obří unilamelární vezikuly (GUV). Dále jsou známé oligolamelární vezikuly (OUV) obsahující většinou 2-5 fosfolipidových dvojvrstev, multilamelární vezikuly (MUV) s velikostí nad 100 nm a přibližně 5-20 fosfolipidovými vrstvami a multivezikulární vezikuly (MVV). MVV jsou liposomy obsahující mnoho malých vezikul enkapsulovaných v jedné velké, hlavní vezikule [1, 31].

V závislosti na požadovaných vlastnostech liposomů existuje hned několik metod jejich přípravy. Každou takovouto přípravu lze rozdělit do tří kroků. Prvním krokem je všeobecně příprava vodného a fosfolipidového roztoku. Vodnou fází je většinou voda, pufr nebo obecně roztok, jenž má být uzavřen ve středu liposomu. Fosfolipidový roztok tvoří fosfolipidy rozpuštěné v organickém rozpouštědle nebo směsi těchto rozpouštědel. Výběr rozpouštědla závisí především na typu požadovaných liposomů a na metodě použité pro jejich charakterizaci. Následně dojde k vysušení fosfolipidové vrstvy například odpařením nebo vymražením. Výsledkem je tenký film fosfolipidové vrstvy na stěnách nádoby.

Druhým krokem jsou tzv. primární procesy, které lze realizovat hned několika metodami. Patří sem například metoda, jež využívá detergentů, elektroformační metoda, metoda vstříkávání fosfolipidů v organickém rozpouštědle do vodné fáze. Další a zároveň nezákladnější metodou primárních procesů je metoda, při níž dochází k hydrataci vysušeného fosfolipidového filmu. Hydratace je realizována vodným roztokem (např. pufr nebo voda). Po jeho přidání se roztok určitou dobu protřepává (v řádu minuty až hodiny). Důvodem je dokonalé promíchání a distribuce fosfolipidových vrstev do vodného roztoku

a následný vznik liposomů. Touto metodou lze připravit směs liposomů o různých velikostech [1, 6, 31]. Další možnou metodou primárních procesů je metoda odpaření reversní fáze. V tomto případě je suchý fosfolipidový film připravený prvním krokem rozpuštěn v organickém rozpouštědle, jež je nemísitelné s vodou. Takovýmto rozpouštědlem je například často využívaný isopropylether a diethylether. Po smíchání lipidového filmu a organického rozpouštědla vzniká roztok reverzních liposomů. K roztoku je následně přidána vodná fáze a po sonikaci tohoto roztoku dojde k vytvoření stabilní emulze, z které se následně odpaří rozpouštědlo a dojde tak k tvorbě unilamelárních liposomů, jež ve svém centru obsahují velké množství použitého rozpouštědla [31]. Opakem této techniky tvorby liposomů je metoda spontánní reversikulace, která se provádí titrací vodného koncentrovaného roztoku fosfolipidů do vodné fáze. Výsledkem jsou liposomy bez obsahu organického rozpouštědla [30].

Třetím a zároveň posledním krokem jsou tzv. sekundární procesy. Sekundární procesy slouží především pro úpravu multilamelárních liposomů na unilamelární nebo menší liposomy. Do sekundárních procesů lze začlenit metody sonikace, mikrofluidace, extruze, vymrazování a metodu dehydratace-rehydratace [6].

Liposomy mají širokou škálu uplatnění. Využívají se především v medicíně a farmakologii jako nosiče, do kterých lze začlenit léčivo nebo jako modely pro studium buněčných interakcí, dále jako nosiče barviv do textilu, pesticidů do rostlin a nemalé využití mají v oblasti kosmetiky. Jejich pomocí lze také studovat rozdělovací koeficienty mezi roztokem analytu a membránou [1, 31].

## **2.3. Studované látky**

### **2.3.1. Tolterodin**

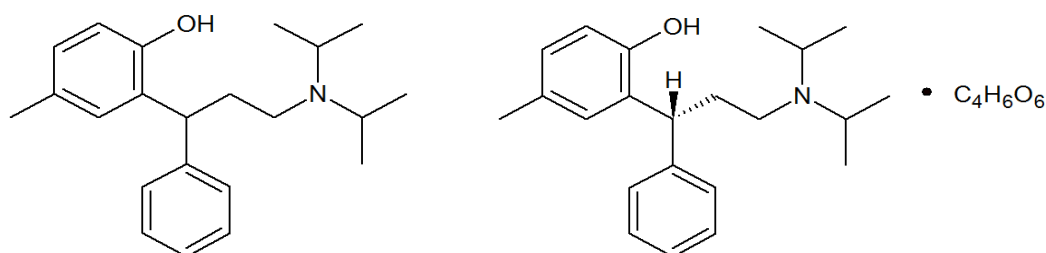
Tolterodin (TOL) (Obr. 9a), jehož chemický vzorec je sumárně  $C_{22}H_{31}NO$ , je látka, která se se svými účinky řadí mezi antimuskarinová léčiva. Tato skupina léčiv slouží k léčbě urgentní inkontinence pacientů, kdy antimuskarinikum blokuje muskarinové receptory a dochází tak k uvolnění svaloviny močového měchýře a zadržení většího množství moči [33, 34].

Tolterodin se vyskytuje ve dvou enantiomerních formách, (*R*) a (*S*). Účinky obou těchto enantiomerních forem jsou ale mírně odlišné. Zatímco (*R*)-TOL, jenž vykazuje anticholinergní aktivitu, umožňuje léčbu hyperaktivního močového měchýře,

enantiomer (*S*)-TOL je využíván zejména pro léčbu střevních poruch a urgentní inkontinence, kdy díky absenci anticholinergního efektu je vhodný zejména pro pacienty, u kterých tento efekt, jenž vykazuje (*R*)-TOL, může způsobovat nejrůznější nežádoucí vedlejší účinky jako je sucho v ústech, tachykardie atd. U (*S*)-TOL enantiomeru byl také prokázán slabý sedativní účinek [35].

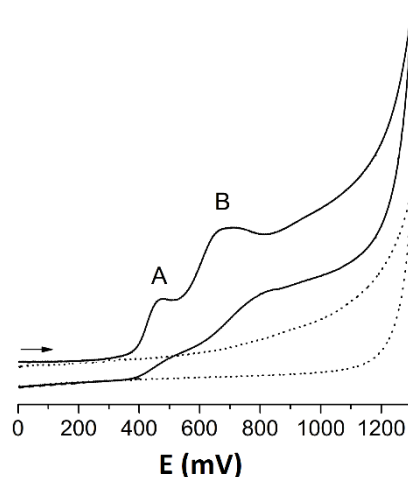
Pro svůj větší léčivý účinek je však častěji využíván (*R*)-TOL, a to ve formě tartrátu (Obr. 9b), pro výrobu léčiv jako Detrusitol nebo Detrol, předepisovaných pro léčbu hyperaktivního močového měchýře.

Tolterodin tartrát je bílý krystalický prášek, dobře rozpustný ve vodě a metanolu, mírně rozpustný v etanolu a prakticky nerozpustný v toluenu [36]. Jeho disociační konstanta je  $pK_a = 9,87$  a molární hmotnost je  $M_r = 475,582$  g/mol [37]. Molární hmotnost samotného tolterodinu (báze) je  $M_r = 325,496$  g/mol [38]. Hodnota logaritmu rozdělovacího koeficientu pro tolterodin je dle chemicko-biologického softwaru ChemAxon  $\log P = 5,12$ . Dle programu ALOGPS je  $\log P = 5,39$  [39].



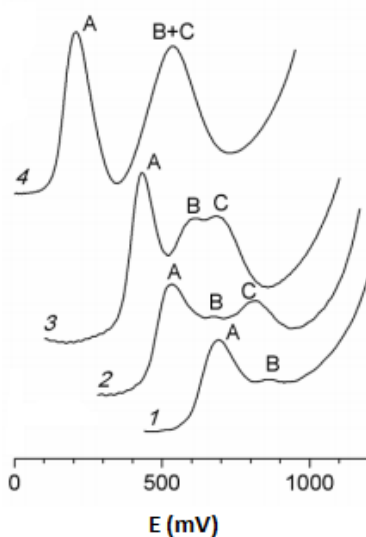
Obr. 9 - Chemická struktura tolterodinu (a) a (*R*)-tolterodinu tartrátu (b) [37, 38]

Oxidačně-redukční vlastnosti tolterodinu byly studovány pomocí elektrochemických metod: cyklické voltametrie (CV), diferenční pulzní voltametrie (DPV) a square-wave voltametrie (SWV). Cyklický voltamogram zaznamenaný při pH 7,4 ukazuje dva signály odpovídající ireverzibilní oxidaci TOL (Obr. 10). První pík (A) se vyskytuje při potenciálu 480 mV a druhý (B) při potenciálu 680 mV. Na anodickou odezvu tolterodinu má zásadní vliv nastavená rychlost skenu, kdy pomocí experimentů bylo dokázáno, že čím vyšší je rychlost polarizace, tím větší je výška obou píků TOL. S vyšší hodnotou rychlosti skenu také dochází k posunu potenciálu k pozitivnějším hodnotám [36, 40].



Obr. 10 - Cyklický voltamogram TOL ( $c = 0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) a základního elektrolytu [40]

Oxidace tolterodinu závisí na hodnotě pH. Při nižších hodnotách pH (do 5,5) převládá ve výsledném voltamogramu pík A (Obr. 11 - voltamogram 1). Pík B se při nižším pH jeví malou intenzitu. Naopak při zvyšování hodnot pH dochází k výskytu třetího píku C (Obr. 11 – voltamogram 2), jehož intenzita se společně s píkem B s rostoucím pH zvyšuje (Obr. 11 – voltamogram 3). Při  $\text{pH} \geq 9$  poté dochází ke splynutí signálů B a C za vzniku velmi výrazného píku označovaného B+C, jak lze vidět na obr. 11, voltamogramu 4 [36, 40].

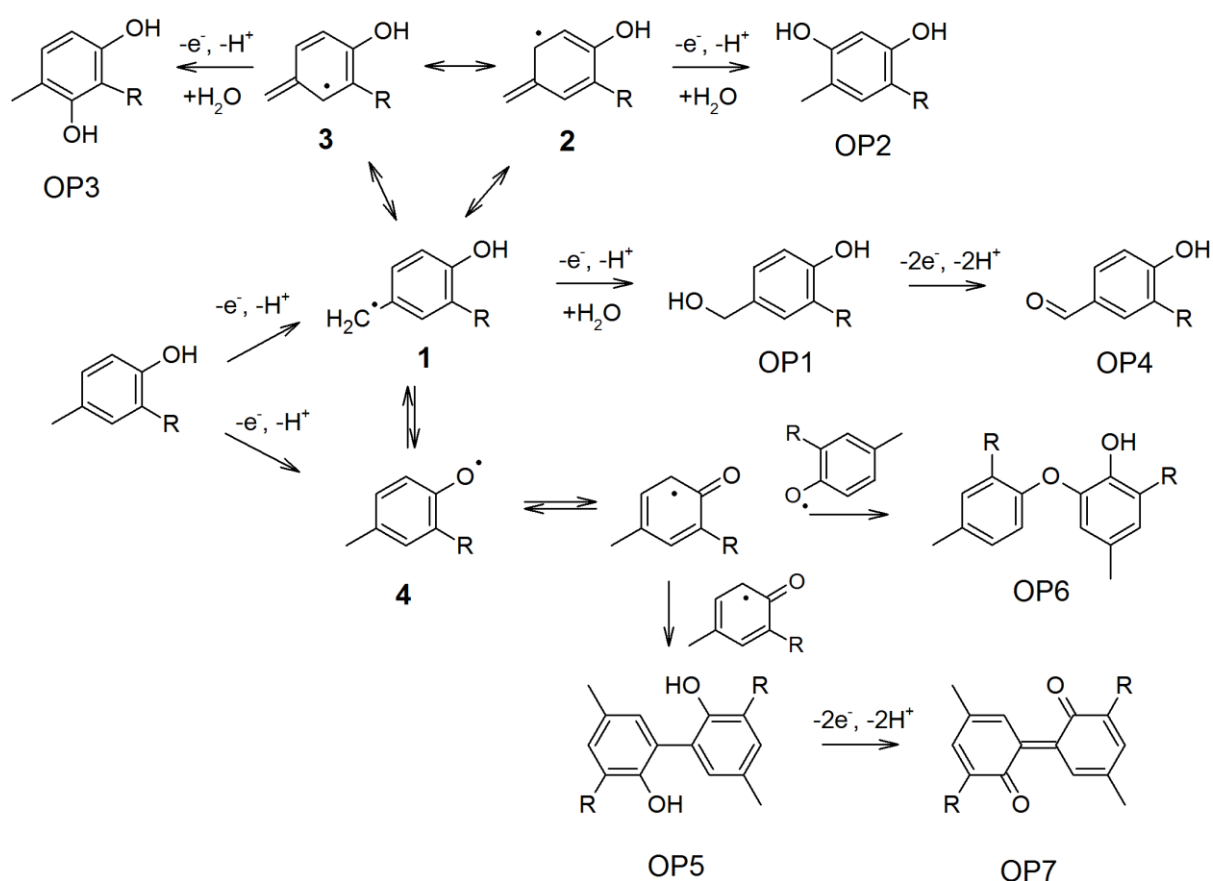


Obr. 11 - Diferenční pulzní voltamogramy TOL ( $c = 0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) při  $\text{pH} < 5,5$  (1),  $\text{pH} = 6,5$  (2),  $\text{pH} = 8,2$  (3) a  $\text{pH} \geq 9$  (4) [36]

Na základě výsledků voltametrické analýzy a elektrolyzy s kontrolovaným potenciálem kombinované s HPLC/MS analýzou byl navrhnout následující mechanismus oxidace tolterodinu (Obr. 12). V prvním kroku může jednoelektronová oxidace vést

k tvorbě benzylového radikálu (1). Ten může být dále oxidován na benzylový kation a hydrolyzován za vzniku 5-HMT (OP1). Další možné rezonanční struktury benzylového radikálu (2, 3) mohou být oxidovány na produkty OP2 a OP3. Současně může jednoelektronová oxidace tolterodinu vést ke vzniku fenolového radikálu (4). Tento fenolový radikál může dále dimerizovat za vzniku produktů OP5 a OP6. Deprotonace hydroxylové skupiny na aromatickém jádře usnadňuje tvorbu fenolového radikálu a tvorbu dimerů [36].

V druhém reakčním kroku je OP1 oxidován na odpovídající aldehyd (OP4). Tato reakce je dobře detekovatelná v kyselých roztocích. V neutrálních a zásaditých roztocích podporuje deprotonace hydroxy derivátů, vytvořených v prvním kroku, tvorbu fenolových radikálů, které společně tvoří dimery. Jejich následná oxidace může vést ke vzniku oligomerů nebo chinonových struktur (OP7). Adsorpce dimerů/oligomerů a chinonových produktů, která byla prokázána voltametrickým experimentem, znečišťuje elektrodu a komplikuje elektrodové reakce [36].



Obr. 12 - Schéma oxidace tolterodinu [36]

Tolterodin a jeho metabolity lze stanovit i mnoha dalšími analytickými metodami. Mezi nejvíce využívané metody stanovení tolterodinu a jeho metabolitů v lidské plazmě patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (HPLC-MS) a ionizací elektrosprejem [41, 42, 43]. Mezi další metody lze zařadit například kapilární elektroforézu [44], potenciometrii [45] a také spektrofotometrické metody jako například spektrofluorimetrii, kterou lze aplikovat jak při stanovení látky v plasmě, tak v tabletách [46].

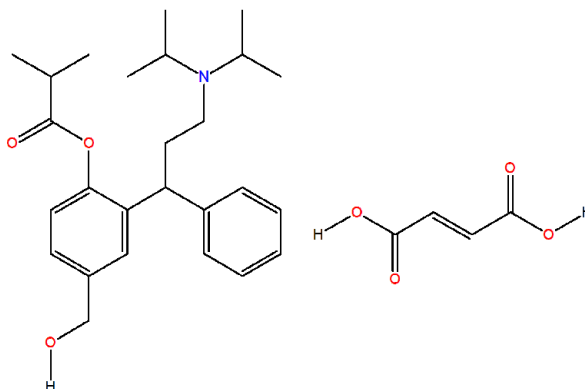
### 2.3.2. Fesoterodin

Fesoterodin (FES), jehož sumární chemický vzorec je  $C_{26}H_{37}NO_3$ , je proléčivo, které se stejně jako tolterodin, ze kterého byl vyvinut, řadí mezi antimuskarinová léčiva k léčbě akutní inkontinence pacientů [47, 48]. Mnohé studie také poukazují na významnou roli fesoterodinu při léčbě nykturie, což je velmi častý zdravotní problém především u starší populace pacientů. Projevem tohoto nežádoucího zdravotního stavu je časté probouzení pacienta během noci pocitem potřeby močení, kterému musí akutně vyhovět. Nykturie tak může způsobit i úmrtí pacienta, způsobené například náhodnými pády při probuzení. Studie prokázaly, že při léčbě fesoterodinem dochází u pacientů ke snížení počtu nočních epizod, což vede ke zvýšení kvality jejich života [49].

Aktivním metabolitem fesoterodinu zodpovědným za veškerou antimuskarinovou aktivitu je 5-hydroxymetyltolterodin (5-HMT), který vzniká rychlou a extenzivní hydrolýzou v těle pomocí nespecifických esteráz. Při této přímé přeměně fesoterodinu na metabolit dochází k vynechání dráhy jaterního enzymatického systému CYP, což může vést k rozdílné aktivitě oproti tolterodinu [50].

Velice podstatné jsou také mnohé výhody fesoterodinu. Jako jediný antimuskarinový přípravek byl společností LUTS-FORTA 2014 klasifikován jako B („Beneficial“), což znamená, že jde o přípravek s prokázanou účinností u starších osob, ale jen s omezenými vedlejšími účinky a obavami o bezpečnost pacientů. K nežádoucím účinkům fesoterodinu patří především sucho v ústech a zácpa [47, 51]. Ostatní antimuskarinové přípravky jsou klasifikovány jako C („Careful“), což znamená, že mají spornou účinnost a bezpečnost při léčbě starších pacientů a nelze je tak například kombinovat s dalšími léky. Mohou tak způsobit vznik různých, velice závažných, nežádoucích účinků. Další neméně podstatnou výhodou fesoterodinu je jeho počas

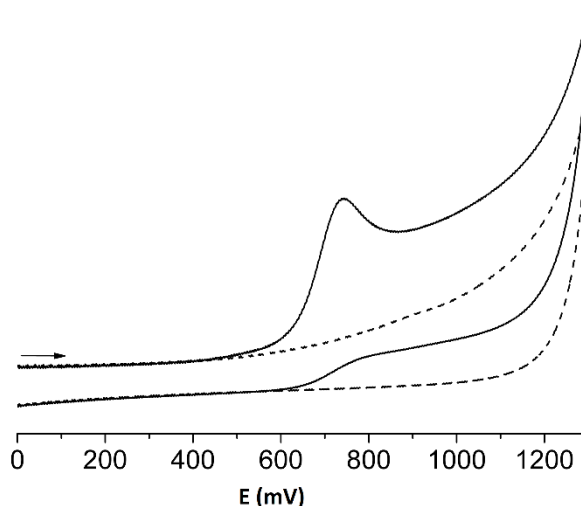
rozpadu, který činí 7 až 9 hodin. Tato skutečnost umožňuje dlouhodobé uvolňování léčiva, čímž dochází k omezení rizika předávkování a vzniku dalších vedlejších účinků [47].



Obr. 13 - Chemická struktura fesoterodinu fumarátu [52]

Stejně jako tolterodin se fesoterodin vyskytuje ve dvou enantiomerních formách, (*R*) a (*S*). Pro léčbu akutní inkontinence se využívá především (*R*)-fesoterodin, a to ve formě fumarátu (Obr. 13), jehož sumární chemický vzorec je  $C_{30}H_{41}NO_7$ . Jde o bílý krystalický prášek rozpustný ve vodě. Jeho molární hmotnost je  $M_r = 527,658$  g/mol. Molární hmotnost samotného fesoterodinu (báze) je  $M_r = 411,586$  g/mol [52, 53]. Hodnota logaritmu rozdělovacího koeficientu fesoterodinu je dle softwaru ChemAxon  $\log P = 5,7$ . Dle programu ALOGPS je  $\log P = 5,45$  [54]. V porovnání s TOL je tedy FES lipofilnější.

Elektrochemicky lze fesoterodin stanovit obdobně jako tolterodin pomocí voltametrických metod (CV, DPV, SWV). Cyklický voltamogram zaznamenaný při pH 7,4 poskytuje pouze jeden anodický oxidační pík, a to při signálu 740 mV (Obr. 14Obr. 14). Při testování stability fesoterodinu při pH 7, 9,5 a 12, bylo dokázáno, že v neutrálním prostředí se jak v čase 0 min, tak po 24 hodinách stání vyskytuje pouze jeden, stejný anodický pík. Signál tohoto píku se však s přibývajícím časem snižuje vlivem adsorpce fesoterodinu na pracovní elektrodu. Naopak při testování stability fesoterodinu v alkalickém prostředí (pH 9,5) se již po době stání 10 min ve výsledném voltamogramu objevuje druhý pík (480 mV). S dobou stání dochází k narůstání intenzity signálu toho píku. Při pH 12 se opět, kromě píku fesoterodinu, vyskytuje druhý pík s hodnotou potenciálu 370 mV, jehož intenzita opět roste s přibývajícím dobou stání. Při porovnání tohoto signálu s prvním píkem 5-HMT, lze říci, že jde o tentýž pík. Fesoterodin se tedy v alkalickém prostředí hydrolyzuje na 5-HMT. Tento proces lze voltametricky sledovat [40].



Obr. 14 - Cyklický voltamogram FES ( $c = 0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) a základního elektrolytu [40]

Na anodickou odezvu fesoterodinu má, stejně jako u tolterodinu, zásadní vliv nastavená rychlost skenu. Čím vyšší je rychlost polarizace, tím větší je výška píku FES. S vyšší hodnotou rychlosti skenu také dochází k posunu potenciálu k pozitivnějším hodnotám, což je typické pro ireverzibilní elektrodové reakce. Analogicky jako u tolterodinu závisí i oxidace fesoterodinu na hodnotě pH. Při pH do hodnoty 5 dochází k oxidaci jen velmi obtížně. Při této hodnotě pH nedochází k zaznamenání žádného signálu. Až při dosažení hodnoty  $\text{pH} = 5$  dochází k výskytu oxidačního píku fesoterodinu, jehož intenzita roste až do dosažení  $\text{pH} = 7,5$ . V rozmezí  $\text{pH} 7,5 - 9$  nebyl zaznamenán žádný konkrétní trend píku fesoterodinu. Při dosažení hodnoty  $\text{pH} = 9$  dochází k výskytu píku, jež odpovídá prvnímu oxidačnímu signálu 5-HMT. Intenzita toho píku se s rostoucím pH dále zvětšuje [40].

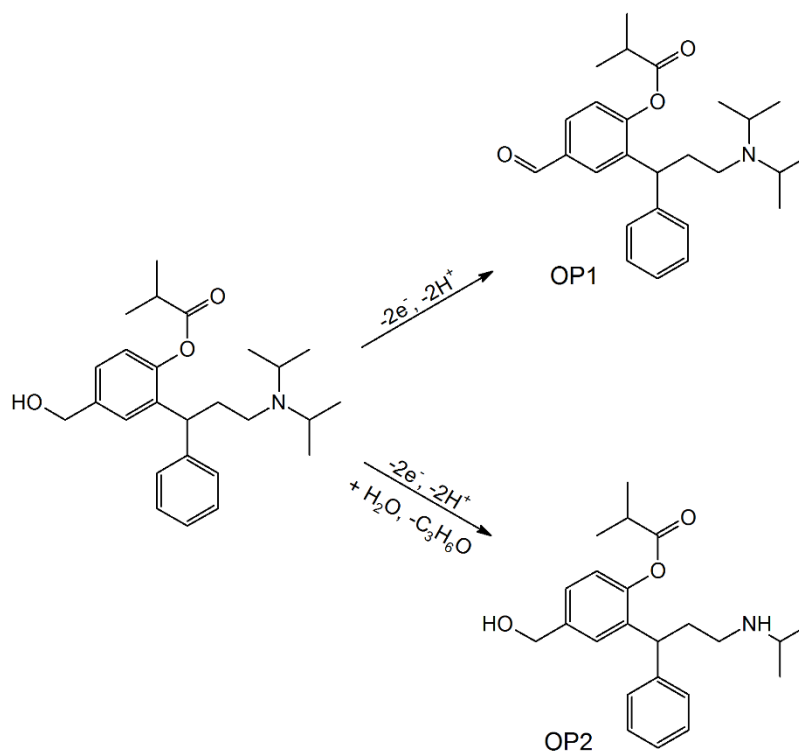
Voltametričnými experimenty bylo zjištěno, že oxidace FES probíhá v jednom ireverzibilním kroku v kyselém a neutrálním prostředí, s využitím dvou elektronů a dvou protonů. Bylo zjištěno, že 5-formylfesoterodin (OP1) je hlavním oxidačním produktem celkové elektrolýzy roztoku fesoterodinu. Tato skutečnost potvrzuje, že benzylalkoholová skupina je oxidovatelnou skupinou FES (Obr. 15) [55]. Oxidace substituovaných benzylalkoholů v acetonitrilu poskytuje odpovídající benzaldehyd prostřednictvím ECEC mechanismu. Oxidační mechanismus zahrnuje reverzibilní jednoelektronový přenos, ve kterém je vytvořen radikálový kation, který je následně deprotonován. Mechanismus oxidace 5-hydroxymethylové skupiny může být podobný. Vyšší pH urychluje uvolnění protonu z kationtového radikálu. To lze sledovat jako zvýšení voltametričného proudu v neutrálním a alkalickém prostředí. Je známo, že benzylalkohol a anisylalkohol oxidované



v acetonitrilu poskytují vysoce reaktivní radikálové kationty, které tvoří polymery. Na rozdíl od těchto aromatických alkoholů nebyla pozorována tvorba dimerních či oligomerních produktů při oxidaci FES. 5-formylfesoterodin může být podroben následné hydroxylaci za podmínek dlouhodobé celkové elektrolyzy ve vodných médiích s dostatečně vysokým potenciálem [55].

Jako další oxidační reakce FES byla pozorována anodická *N*-dealkylace. Anodická oxidace terciárních aminů byla studována v nevodném prostředí, směsném acetonitril/vodném a vodném alkalickém prostředí. Tato reakce probíhá ECE mechanismem zahrnujícím jeden elektron přenesený z dusíkového atomu a následnou ztrátu protonu ze sousedního alkyly vedoucí k tvorbě neutrálního radikálu. Disproporcionace nebo následná oxidace tohoto radikálu a jeho reakce s vodou poskytuje *N*-dealkylovaný sekundární amin a aldehyd, které jsou finálními produkty. Oxidační *N*-dealkylace fesoterodinu může probíhat také v kyselém prostředí [55].

Celkový dvou-elektronový proces, nalezený jak coulometrickou, tak voltametrickou konvoluční analýzou a současně tvorba obou produktů OP1 a OP2 naznačují, že oxidace FES tedy probíhá buď na benzylalkoholové nebo alkyl aminoskupině (Obr. 15) [55].



Obr. 15 - Schéma oxidace FES [55]

Mezi další analytické metody využívané pro stanovení fesoterodinu patří například metoda LC–ESI-MS/MS pro stanovení ve vzorku lidské plazmy [56], kapilární elektroforéza pro stanovení FES v tabletě léčiva [57] nebo UV-spektrofotometrická metoda, jejíž výsledky jsou srovnatelné s metodami LC, CE a LC/MS-MS, jež jsou pro stanovení validovány [58].

## **2.4. Použité elektrochemické metody**

### **2.4.1. Voltametrie**

Voltametrie je obecně metoda, při níž se sleduje závislost proudu, jenž prochází pracovní elektrodou ponořenou v analyzovaném roztoku, na potenciálu, který se na tuto pracovní elektrodu vkládá z vnějšího zdroje. Výsledkem této závislosti proudu na potenciálu je tzv. polarizační křivka.

Elektrochemickým článkem pro voltametrická měření je tzv. voltametrická cela. Ta kromě pracovní elektrody (může být rtuťová nebo z tuhých materiálů), ponořené do analyzovaného vzorku, obsahuje také elektrodu referentní, které je spojená s analyzovaným vzorkem solným můstkem. Referentní elektrody bývají elektrody II. druhu, především kalomelová, argentschloridová nebo merkurosulfátová. Voltametrická cela obsahuje případně ještě třetí, a to pomocnou elektrodu. Tyto pomocné elektrody se vyrábí z inertního materiálu jako například platina nebo uhlík a jsou ve tvaru plíšku, drátku či tyčinky. Od analyzovaného roztoku mohou být oddělovány přepážkou, která brání možné kontaminaci analyzovaného roztoku [59].

#### **2.4.1.1. Extrakční voltametrie**

Extrakční voltametrie je metoda podobná adsorpční rozpouštěcí voltametrii. Při rozpouštěcí voltametrii dochází ke zlepšení poměru signál/šum prekoncentrací analytu na elektrodě před samotným měřením. Analyt se v tomto případě adsorbuje na povrchu elektrody při určitém potenciálu, a poté je stanovován jeho rozpouštěním oxidací či redukcí. Tato metoda se dá využít, i pokud analyt není elektroaktivní, protože se při dosažení určitého potenciálu může začít desorbovat z elektrody a může tak docházet ke změně kapacitního proudu. Tato metoda je vhodná ke stanovení i stopového množství analytu [59].

Rozdílem v ekstrakční voltametrii je neelektrolytická adsorpce/extrakce analytu, tedy bez využití vnějšího potenciálu. Toho lze docílit například použitím uhlíkových pastových elektrod, které se připravují smícháním uhlíkového prášku s pojivem. Jako

pojivo se nejčastěji využívá např. parafinový nebo silikonový olej. Do těchto elektrod se dá extrahovat nepolární látka (využití obecného Liebigova pravidla „Podobné se rozpouští v podobném“ – „*Similia similibus solventur*“), dojde k její prekoncentraci, a poté ji lze voltametricky stanovit [60, 61]. Díky této technice lze stanovovat nejrůznější biologicky aktivní organické látky. Výhodou využití extrakce je také to, že není potřeba složitě upravovat vzorek, např. moč, ale díky vysoké selektivitě lze extrahovat pouze sledovanou látku. Ta se poté dá stanovit buď přímo v roztoku vzorku, nebo se elektroda po extrakci může přenést do čistého roztoku elektrolytu a látka se tak může stanovit bez přítomnosti interferentů obsažených v matrici vzorku, tzv. metodou výměny roztoků či transferovou technikou. Limity detekce se pak pohybují od  $10^{-9}$  do  $10^{-12}$  mol/dm<sup>3</sup> [62, 63].

Ke zlepšení analýzy lze využít také modifikaci elektrod, nejčastěji lipidy, se kterými biologicky aktivní látky v organismu interagují. Lipidová vrstva na elektrodě tak simuluje reálnou biologickou membránu a zlepšuje extrakci látek do elektrody. Příkladem může být stanovení léčiva promethazinu s využitím lipidy modifikované uhlíkové pastové elektrody, kdy pětiminutová prekoncentrace vedla ke čtyřicetinásobnému zvýšení signálu v porovnání s experimentem bez akumulace [64].

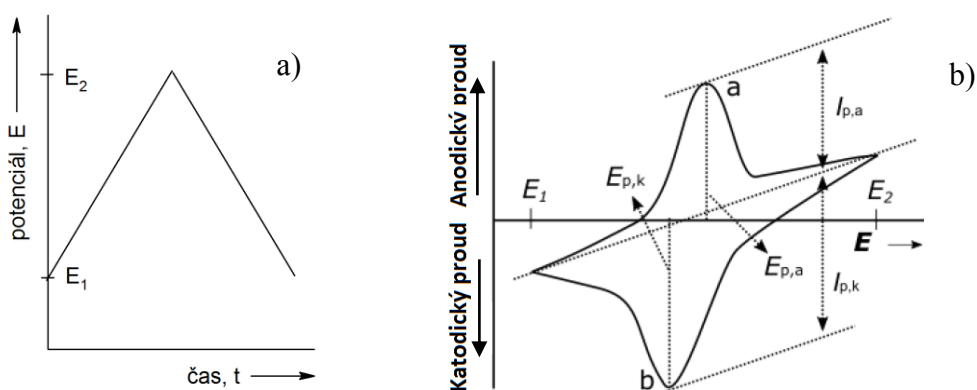
Příkladem aplikace extrakční voltametrie může být studie Khodariho, který testoval vliv modifikace uhlíkové pastové elektrody mastnými kyselinami s různě dlouhými řetězci na stanovení léčiva trimipraminu. Pro analýzu byla využívána metoda výměny roztoků, kdy léčivo bylo extrahováno do elektrody ze vzorku moči, a poté měřeno v roztoku elektrolytu tvořeném fosfátovým pufrům (pH = 9). U modifikovaných elektrod byl zaznamenán nárůst sledovaných proudů oproti čisté elektrodě, ovšem velikost proudové odezvy byla nepřímo úměrná délce uhlíkového řetězce daných mastných kyselin. Nejvyšší odezvu tak dávala elektroda modifikovaná kyselinou laurovou (C<sub>12</sub>), nižší byla u kyseliny stearové (C<sub>18</sub>) a nejnižší u kyseliny lignocerové (C<sub>24</sub>) [65].

#### **2.4.1.2. Cyklická voltametrie**

Cyklická voltametrie (CV) patří mezi elektrochemické dynamické metody. Podstatou této metody je vložení počátečního potenciálu z vnějšího zdroje na pracovní elektrodu, ponořenou do nemíchaného roztoku. CV se skládá ze dvou částí. První částí je tzv. dopředný sken, při kterém se počáteční potenciál lineárně zvyšuje až k tzv. přepínacímu potenciálu. Při dosažení této hodnoty se potenciál začne opět snižovat k počáteční hodnotě. V tomto případě se jedná o tzv. zpětný sken. Tyto dvě části

tvoří celkově jeden cyklus cyklické voltametrie. Měření je možné provádět jak v jednom, tak v několika cyklech [60, 67, 68].

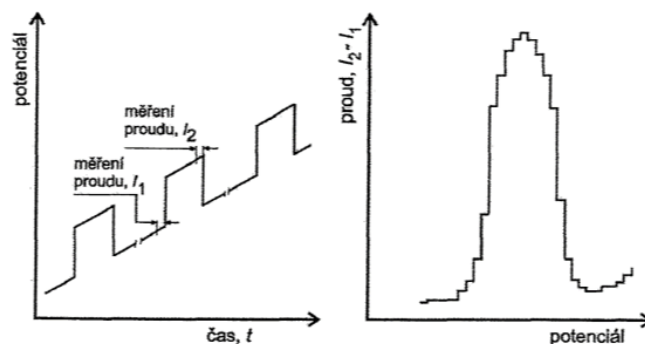
Potenciál trojúhelníkového průběhu na pracovní elektrodě je znázorněn na obr. 16. Výsledkem je závislost proudu na vloženém napětí, tzv. cyklický voltamogram. Poloha (potenciál) píku na tomto voltamogramu charakterizuje látku kvalitativně a výška (proud) tohoto píku látku charakterizuje kvantitativně [4, 69]. Hlavní význam CV spočívá ve studiu elektrodových reakcí, kdy z průběhu katodických a anodických křivek lze určit mechanismus dané elektrodové reakce, např. její reverzibilitu [59].



Obr. 16 - a) průběh trojúhelníkového vkládaného potenciálu CV b) cyklický voltamogram [59]

### 2.4.1.3. Diferenční pulsní voltametrie

Diferenční pulsní voltametrie (DPV) je elektrochemická metoda, při které je pracovní elektroda polarizována potenciálem, jenž se lineárně mění s časem (tzv. potenciálová rampa). Na tuto rampu se vkládají napěťové pulsy o amplitudě 10-100 mV. Pulsy se na stejnosměrnou potenciálovou složku vkládají v určitých časových intervalech, a to v době trvání řádově desítek milisekund. Při měření se zaznamenává rozdíl proudů změřených těsně před vložením pulsu a poté na jeho konci. Měření (vzorkování) proudu probíhá v řádu jednotek až desítek ms. Závislost rozdílu těchto naměřených proudů na potenciálu znázorňuje graf ve tvaru píku (Obr. 17), jehož poloha na potenciálové ose určuje analyt kvalitativně a výška tohoto píku závisí na koncentraci analytu [4, 59].

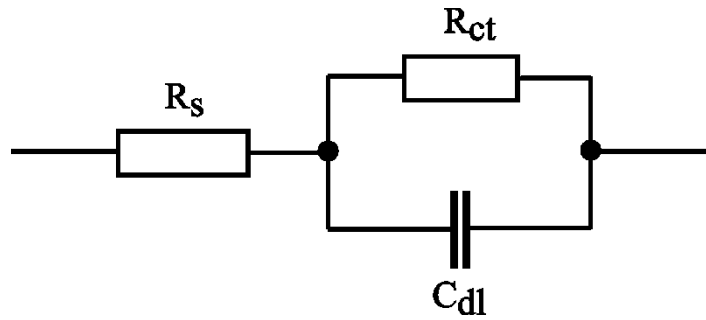


Obr. 17 - Vkládaný potenciál a proudová odezva při diferenční pulsní voltametii [59]

### 2.4.2. Elektrochemická impedanční spektroskopie

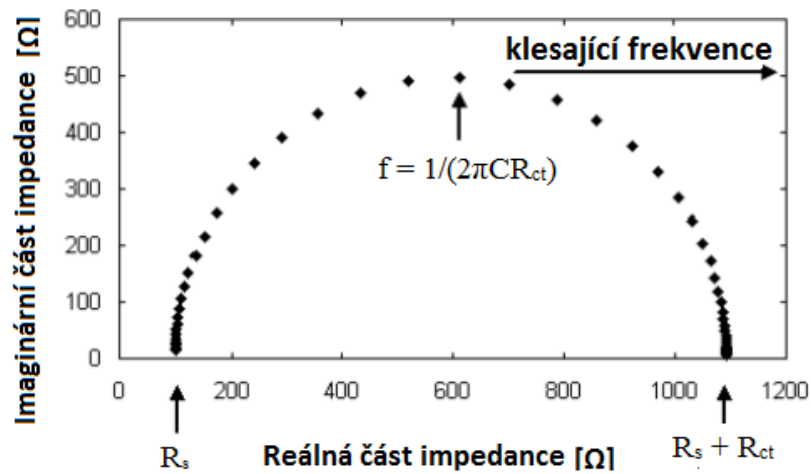
Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS) je velmi významnou technikou především v oblasti fyzikální elektrochemie [71]. Jde o metodu výzkumu objemových a mezifázových elektrických vlastností různých druhů materiálů. Tyto materiály mohou být jak pevné, tak i kapalné, spojené s vhodným elektrochemickým převodníkem. Principem EIS je vkládání konstantního potenciálu modulovaného střídavým napětím sinusového průběhu o amplitudě v rozsahu nejčastěji 5-10 mV na pracovní elektrodu, přičemž se měří střídavá složka proudové odezvy. Potenciál může být buďto vložen na elektrodu, nebo lze měření provést při potenciálu nezapojené elektrody. Frekvence střídavého napětí je při měření závislá na čase, se kterým se mění většinou od vyšších hodnot frekvence k nižším, a to především kvůli stabilitě některých systémů. Rozsah frekvence je přibližně 1 MHz až 0,1 mHz [72].

K nejvíce používaným grafickým výstupům EIS patří Bodeův a Nyquistův graf. Bodeův graf může zobrazovat závislost absolutní hodnoty impedance nebo fázový posun oproti frekvenci. Vše může být zaznamenáno buď do jednoho grafu, který pak obsahuje dvě osy y, nebo lze každou závislost vynést samostatně do dvou grafů. V případě Nyquistova grafu je vynášena závislost imaginární složky na reálné složce impedance [72]. Nejjednodušším modelem pro rozhraní elektroda-roztok je tzv. Randlesova cela neboli také Randlesův obvod (Obr. 18), který je základním modelem pro modely složitější. Randlesův ekvivalentní obvod se skládá ze sériově zapojeného odporu elektrolytu ( $R_s$ ) a paralelní kombinace odporu proti přenosu náboje ( $R_{ct}$ ) a kapacity elektrické dvojvrstvy ( $C_{dl}$ ) [73]. Na obr. 19 lze vidět Nyquistův graf pro Randlesovu celu.



Obr. 18 - Schéma Randlesova obvodu [74]

EIS se využívá pro široké spektrum technologií a aplikací jako například při kontrole a výrobě palivových článků, polovodičů, solárních článků a senzorů, při zkoumání elektroodpadu, nebo při elektro-organické syntéze [71, 75]. Velice významné je také studium koroze kovových materiálů [76] a využití této metody pro charakterizaci povrchu elektrod vrstvami modifikátorů, např. fosfolipidů [77].



Obr. 19 - Nyquistův graf pro Randlesovu celu [72]

## 3. Experimentální část

### 3.1. Přístrojové vybavení

Veškerá elektrochemická měření byla realizována pomocí přístroje Autolab PGSTAT128N (Metrohm Autolab, Utrecht, Nizozemsko) s využitím softwaru Nova (verze 1.11) (Metrohm Autolab, Utrecht, Nizozemsko) a tříelektrodového zapojení. Pracovní elektrodou v tomto zapojení byla elektroda ze skelného uhlíku - GCE (MF-2012, průměr disku 3 mm, BASi, USA). Jako referentní byla použita elektroda argentschloridová (Ag/AgCl/1M-KCl) a pomocnou elektrodou byla elektroda platinová.

Pro čištění povrchu pracovní elektrody byla využita ultrazvuková čistička Sonorex Digitec (Bandelin, Berlín, Německo). K navážení látek využitých pro přípravu roztoků byly použity váhy Kern ALS 220-4 (KERN, Balingen, Německo) a váhy XSE205 Dual Range (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA). Při přípravě fosfátového pufru a ověřování jeho hodnoty pH byl využit pH metr inoLab 720 s elektrodou SenTix 41 (WTW, Weilheim, Německo). Pro míchání roztoků byla použita magnetická míchačka MR Hei-Standard (Heidolph, Schwabach, Německo). Pro přípravu roztoků byla použita ultračistá voda (18 M $\Omega$ ) z purifikačního systému Direct-Q 3 UV (Merck Millipore).

### 3.2. Chemikálie

Pro modifikaci GCE, a tedy i tvorbu modelových membrán, byl použit asolectin izolovaný ze sójových bobů (obsah fosfatidylcholinu zhruba 25 %) (Fluka, Buchs, Švýcarsko). K jednotlivým stanovením byly využity zásobní roztoky studovaných antimuskarinik připravené rozpuštěním daného množství (*R*)-fesoterodinu fumarátu (99+%, Chemos CZ, Cítov, Česká Republika) a tolterodinu tartrátu (Zentiva, Praha, Česká Republika) ve vodě.

Dále byly použity tyto chemikálie:

- ferrikyanid draselný (p.a., Lachema, Brno, Česká republika)
- ferrokyanid draselný (p.a., Lachema, Brno, Česká republika)
- hexan (p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- hydroxid draselný (p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- chlorid sodný (p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- metanol (p.a., Penta, Chrudim, Česká republika)
- kyselina o-fosforečná 85% (p.a., Penta, Chrudim, Česká republika)

### 3.3. Příprava roztoků

Pro experimenty byly využity dva roztoky asolectinu. První o koncentraci 3 mg/ml byl připraven rozpuštěním daného množství této fosfolipidové směsi v hexanu. Druhý roztok o koncentraci 8 g/l byl připraven rozpuštěním daného množství asolectinu ve vodě.

Při měření byly použity roztoky stanovovaných antimuskarinových léčiv tolterodinu a fesoterodinu v koncentracích 1 mmol/l a 2 mmol/l. Roztoky byly připraveny rozpuštěním vypočítaného množství těchto látek v destilované vodě. Fosfátový pufr o pH 7,4 byl připraven titrací kyseliny trihydrogenfosforečné (0,1 mol/l) hydroxidem sodným (2 mol/l). Roztok chloridu sodného (9 g/l) a roztok ekvimolární směsi ferrikyanidu a ferrokyanidu draselného (1 mmol/l každý) v NaCl (9 g/l) byly připraveny navážením vypočítaného množství látek a rozpuštěním ve vodě.

Roztoky pro akumulaci analytu byly připraveny zředěním zásobního roztoku jak TOL, tak FES (oba 1 mmol/l) fosfátovým pufrem o pH 7,4 a vodou v objemovém poměru 2:5:3. Výsledná koncentrace takto připravených roztoků byla u TOL i FES  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l.

Dále byl připraven roztok vzorku moči, a to naředím 200  $\mu$ l moči základním elektrolytem v poměru 1:4. Základní elektrolyt byl v tomto případě tvořen 500  $\mu$ l fosfátového pufru o pH 7,4 a 300  $\mu$ l vody.

### 3.4. Použité pracovní postupy

#### 3.4.1. Čištění nepokryté elektrody

Před každým voltametrickým měřením s nemodifikovanou elektrodou byla potřeba důkladně vyčistit povrch pracovní elektrody ze skelného uhlíku od nečistot. Nejprve byla elektroda opláchnuta destilovanou vodou. Poté byla vyleštěna na leštící tkanině, na kterou bylo pomocí automatické pipety nanášeno malé množství aluminové suspenze v destilované vodě. Po tomto mechanickém vyleštění byla elektroda opět opláchnuta destilovanou vodou, sonikována 1 minutu v destilované vodě a poté znovu opláchnuta. Takto očištěná elektroda byla připravena k měření.

#### 3.4.2. Modifikace pracovní elektrody vrstvou fosfolipidů

Před samotným pokrýváním elektrody ze skelného uhlíku bylo potřeba elektrodu dokonale očistit od nečistot vyleštěním na leštící tkanině navlhčenou aluminovou suspenzí. Po opláchnutí a sonikaci v destilované vodě po dobu 2 minut bylo potřeba elektrodu aktivovat. Aktivace byla provedena v tříelektrodovém zapojení pomocí roztoku



NaCl (9 g/l) při potenciálu 1,5 V, který byl na pracovní elektrodu vkládán po dobu 3 minut. Poté byla elektroda opět opláchnuta destilovanou vodou a vysušena proudem dusíku po dobu 30 minut.

Na disk takto připravené, vysušené CGE, bylo naneseno 5  $\mu$ l čerstvě připraveného roztoku asolectinu v hexanu (3 mg/ml). Ihned po nanesení roztoku asolectinu byla elektroda ponořena do roztoku NaCl (9 g/l) na dobu 30 minut, kdy na elektrodě došlo k samouspořádání fosfolipidů do dvojné vrstvy. Po uplynutí dané doby byla elektroda z roztoku vyjmuta a opatrně opláchnuta destilovanou vodou. S takto připravenou elektrodou byly měřeny jednotlivé experimenty. Při jakékoli další manipulaci s modifikovanou elektrodou bylo velice důležité velmi opatrné zacházení, aby nešlo k poškození vzniklé fosfolipidové dvojvrstvy.

### **3.4.3. Čištění GCE od vrstvy fosfolipidů**

Čištění elektrody od fosfolipidové dvojvrstvy a obnovení povrchu GCE bylo provedeno následujícím postupem. Nejprve byla elektroda vyleštěna na leštící tkanině navlhčené aluminovou suspenzí. Poté byla opláchnuta proudem destilované vody a sonikována ve třech rozpouštědlech v následujícím pořadí – v hexanu, metanolu a v destilované vodě. V každém z těchto rozpouštědel byla elektroda sonikována po dobu 10 minut. Při potřebě ještě důkladnějšího přečištění bylo k tomuto postupu přidáno přečištění v roztoku NaOH (0,1 mmol/l).

### **3.4.4. Kontrola čistoty GCE a celistvosti modelové membrány**

Pro testování čistoty nepokryté GCE, ale také pro testování celistvosti vytvořené fosfolipidové dvojvrstvy na povrchu GCE byly využity metody CV a EIS. Při metodě CV byl vždy pro porovnání srovnáván výsledný cyklický voltamogram před pokrytím elektrody s cyklickým voltamogramem získaným po pokrytí elektrody. Stejný postup následoval i v případě metody EIS při zaznamenávání Nyquistových diagramů.

Měření pomocí obou metod, s pokrytou i nepokrytou elektrodou, probíhalo v roztoku ferrikyanidu draselného (1 mmol/l) a ferrokyanidu draselného (1 mmol/l) v NaCl (9 g/l) v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou zde byla GCE, jako referentní byla použita elektroda argentchloridová a pomocnou elektrodou byla elektroda platinová. Při metodě CV pro všechna tato stanovení byly vždy nastaveny následující parametry:

- Počáteční potenciál: 0 V
- Konečný potenciál: 0 V
- Potenciálový rozsah: - 0,4 až 0,7 V
- Rychlost skenování: 0,05 V/s
- Počet cyklů: 2

Při metodě EIS byly při každém experimentu nastaveny následující parametry:

- Konstantní potenciál: 0,250 V
- Počet frekvencí: 60
- Rozsah frekvencí: 10 kHz – 0,05 Hz

### 3.4.5. Stabilita modelové membrány

Metody CV i EIS byly využity také pro zjištění stability vrstvy asolectinu na GCE jednak ve vodě, jednak v roztoku FES. Při měření stability vrstvy asolectinu na GCE ve vodě byla pokrytá elektroda vždy na daný čas (rozsah 0,5 až 5 min) ponořena do redestilované vody. V případě stability vůči působení FES byla pokrytá elektroda ponořena na daný čas (0,5 až 5 min) do roztoku FES o koncentraci  $10^{-4}$  mol/l. Po vyjmutí z roztoku byla elektroda opatrně opláchnuta. Poté byl zaznamenán voltamogram a Nyquistův diagram. Pomocí CV a EIS byla taktéž sledována stabilita fosfolipidové dvojvrstvy při ponechání GCE s vrstvou asolectinu v roztoku NaCl (9 g/l) po dobu tří dnů. Všechna tato měření probíhala v roztoku ferrikyanidu draselného (1 mmol/l) a ferrokyanidu draselného (1 mmol/l) v NaCl (9 g/l) v tříelektrodovém zapojení. Při metodě CV pro všechna tato stanovení byly nastaveny shodné parametry jako v kapitole 3.4.4.

### 3.4.6. Akumulace analytu

Akumulace analytu byla měřena metodou diferenční pulsní voltametrie. Byla měřena akumulace jak na povrchu čisté, nepokryté elektrody, tak akumulace analytu ve vytvořené, fosfolipidové dvojvrstvě na povrchu GCE.

Měření probíhalo následovně. Nejprve byl vždy připraven 1 ml roztoku daného antimuskarinika, ve kterém adsorpce probíhala. Při měření na čisté elektrodě byla potřeba GCE mezi každým měřením důkladně vyleštit na leštící tkanině navlhčené suspenzí aluminy a opláchnout destilovanou vodou. Po tomto očištění byla elektroda sonikována po dobu 1 minuty v destilované vodě, kterou byla GCE ještě jednou důkladně opláchnuta. Poté následovalo ponoření elektrody do připraveného roztoku antimuskarinika na daný čas. Při měření adsorpce na povrch nepokryté GCE byly u obou antimuskarinik doby akumulace 30 s, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min a 5 min. Po naakumulování analytu na povrch

GCE byla elektroda opět opatrně opláchnuta destilovanou vodou a byl zaznamenán voltamogram. Poté byla elektroda opět očištěna a připravena k dalšímu měření. Základním elektrolytem pro všechna měření akumulace na povrch čisté GCE byl roztok fosfátového pufru o pH 7,4 a redestilované vody v poměru 1:1.

Postup při sledování extrakční akumulace analytu do fosfolipidové vrstvy na GCE byl v podstatě stejný. Stejně jako u akumulace na nepokryté elektrodě byl nejdříve připraven 1 ml roztoku antimuskarinika. Poté byla elektroda s připravenou fosfolipidovou vrstvou do toho roztoku ponořena na daný čas (0,5 až 5 min). Nakonec byla elektroda opatrně opláchnuta destilovanou vodou, aby nedošlo k poškození dvojvrstvy a vložena do základního elektrolytu, kterým byl opět roztok fosfátového pufru o pH 7,4 a vody v poměru 1:1. Po zaznamenání voltamogramu byla elektroda znovu velmi opatrně opláchnuta destilovanou vodou a připravena k dalšímu měření. Tímto způsobem byla akumulace analytu do fosfolipidové vrstvy proměřena pouze u FES. Při této metodě byly pro pokrytou, nepokrytou elektrodu, TOL i FES nastaveny následující parametry:

- Počáteční potenciál: 0,0 V
- Konečný potenciál: 1,4 V
- Amplituda: 0,05 V
- Doba trvání pulsu: 0,5 s
- Rychlost skenování: 0,01 V/s

#### **3.4.7. Interakce asolectinu a antimuskarinik**

Interakce asolectinu a daných antimuskarinik byla měřena metodou DPV. Pro měření byly využity roztoky TOL a FES o koncentraci 2 mmol/l a dále roztok TOL o koncentraci 1 mmol/l. Měření probíhalo v tříelektrodovém zapojení, kdy pracovní elektrodou byla nepokrytá GCE. Samotné měření probíhalo následovně. Nejprve byla elektroda důkladně očištěna od zbytků nečistot a vyleštěna. Poté bylo k základnímu elektrolytu v měrné cele, kterým byl roztok fosfátového pufru o pH 7,4 a redestilované vody, bylo přidáno takové množství antimuskarinika, že jeho výsledná koncentrace v roztoku byla  $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Následně byly do výsledného roztoku přidávány malé objemy asolectinu. Vše bylo krátce promícháno proudem dusíku a byl zaznamenán voltamogram. Parametry nastavené pro tato měření interakce asolectinu s TOL a FES metodou DPV byly shodné jako v kapitole 3.4.6.

### 3.4.8. Kalibrační závislosti TOL a FES

Kalibrační závislosti FES a TOL byly proměřené jak na nepokryté, tak na pokryté elektrodě. Pro všechna tato měření byla využita metoda diferenční pulsní voltametrie. Základním elektrolytem (ZE) byl v obou případech roztok fosfátového pufru o pH 7,4 a vody. Pro kalibrační závislost tolterodinu i fesoterodinu na nepokryté elektrodě bylo rozmezí koncentrací  $1 \cdot 10^{-6}$  až  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Pro měření kalibrační závislosti TOL a FES na pokryté elektrodě byl zvolen rozsah koncentrací  $1 \cdot 10^{-5}$  až  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Kalibrační závislosti daných látek s nepokrytou elektrodou byly měřeny přímo v roztoku, v němž byla metodou přidavku zvyšována koncentrace studované látky (přímá metoda). V případě pokryté elektrody byla využita extrakční akumulace do vrstvy v roztoku látky o definované koncentraci, poté následovalo měření metodou DPV v čistém základním elektrolytu (transferová metoda). Při měření kalibrační závislosti TOL přímou metodou byly nastaveny tyto parametry:

- Počáteční potenciál: 0,0 V
- Konečný potenciál: 1,4 V
- Amplituda pulsu: 0,05 V
- Doba trvání pulsu: 0,05 s
- Rychlost skenu: 0,01 V/s

Při měření kalibrační závislosti FES byly nastaveny tyto parametry:

- Počáteční potenciál: 0,2 V
- Konečný potenciál: 1,0 V
- Amplituda pulsu: 0,05 V
- Doba trvání pulsu: 0,5 s
- Rychlost skenu: 0,01 V

### 3.4.9. Stanovení FES ve vzorku moči

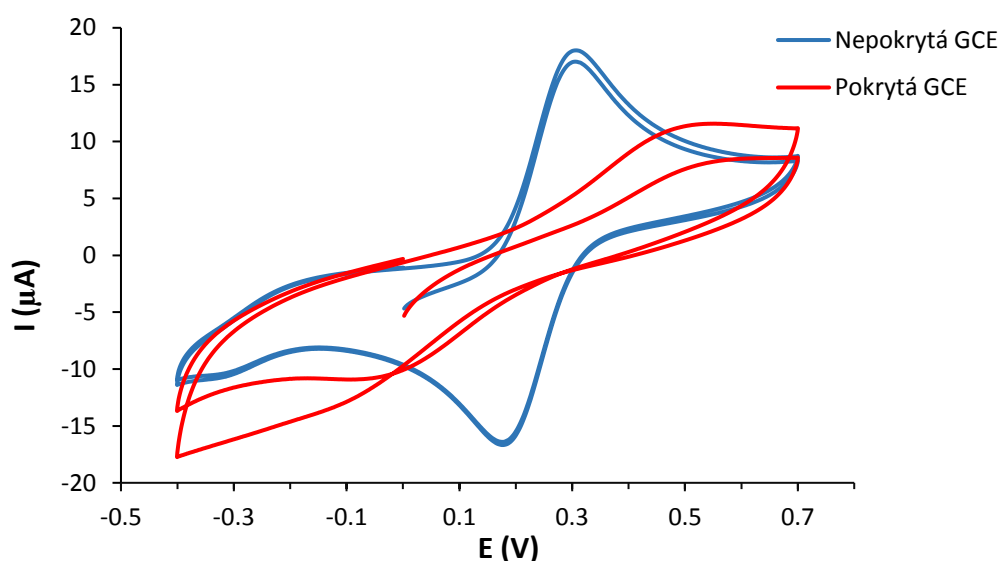
FES ve vzorku moči byl stanoven pomocí metody DPV. Před samotným měřením byla pomocí CV a EIS ověřena celistvost vytvořené fosfolipidové dvojvrstvy na povrchu GCE postupem uvedeným v kapitole 3.4.4. Nejdříve byl s využitím tříelektrodeového zapojení, kde pracovní elektrodou byla pokrytá GCE, proměřen čistý základní elektrolyt, kterým byl opět roztok fosfátového pufru o pH 7,4 a redestilované vody v poměru 1:1. Poté byl připraven zředěný vzorek moči, do kterého byla elektroda s vrstvou asolectinu na 5 minut ponořena. Znovu byl zaznamenán voltamogram měřením v základním elektrolytu a elektroda byla opatrně opláchnuta destilovanou vodou. Následně bylo do zředěného vzorku moči přidáno 20  $\mu$ l roztoku FES o koncentraci 1 mmol/l a opět byl zaznamenán voltamogram. Přídavek roztoku FES se ještě jednou opakoval.

## 4. Výsledky

### 4.1. Kontrola čistoty GCE a celistvosti modelové membrány

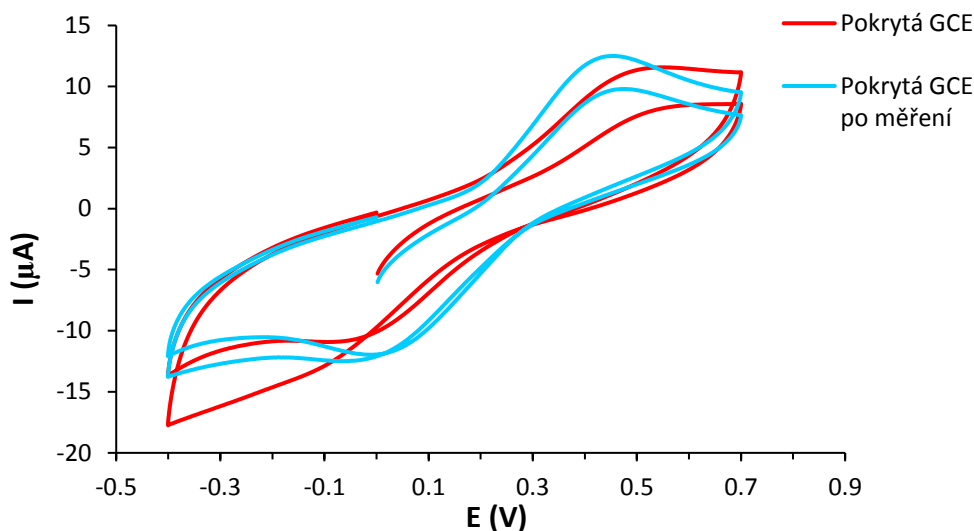
#### 4.1.1. Cyklická voltametrie

Pomocí cyklické voltametrie byla kontrolována čistota nepokryté GCE a celistvost fosfolipidové dvojvrstvy na povrchu GCE. Na obr. 20 jsou zobrazeny cyklické voltamogramy jak elektrody nepokryté, tak elektrody pokryté vrstvou asolectinu zaznamenané v roztoku ferrikyanidu draselného (1 mmol/l) a ferrokyanidu draselného (1 mmol/l) v NaCl (9 g/l). Při měření s využitím nemodifikované GCE lze na výsledném voltamogramu vidět velice výrazné píky. Ty odpovídají oxidaci ferrokyanidu ( $E_{p,a} = 0,29$  V) a zpětné redukci ferrikyanidu ( $E_{p,k} = 0,18$  V) oxidace ferrokyanidu a následné zpětné redukci ferrikyanidu. V případě voltamogramu získaného pomocí modifikované GCE lze vidět výrazné snížení velikostí těchto oxidačně-redukčních píků vlivem vytvoření hydrofobní, nevodivé dvojvrstvy fosfolipidů, která zamezila přístupu iontů z roztoku k povrchu GCE.



Obr. 20 - Cyklické voltamogramy elektrody nepokryté a pokryté

Na obr. 21 lze vidět srovnání cyklického voltamogramu zaznamenaného v roztoku ferrikyanidu draselného (1 mmol/l) a ferrokyanidu draselného (1 mmol/l) v NaCl (9 g/l) těsně po pokrytí elektrody vrstvou asolectinu s cyklickým voltamogramem zaznamenaným po sledování extrakční akumulace FES v závislosti na čase. Z tohoto srovnání je patrné, že opět dochází k mírnému nárůstu píků, nejspíše vlivem inkorporace oxidačních produktů fesoterodinu do fosfolipidové dvojvrstvy, které mohou mírně narušit její celistvosti.



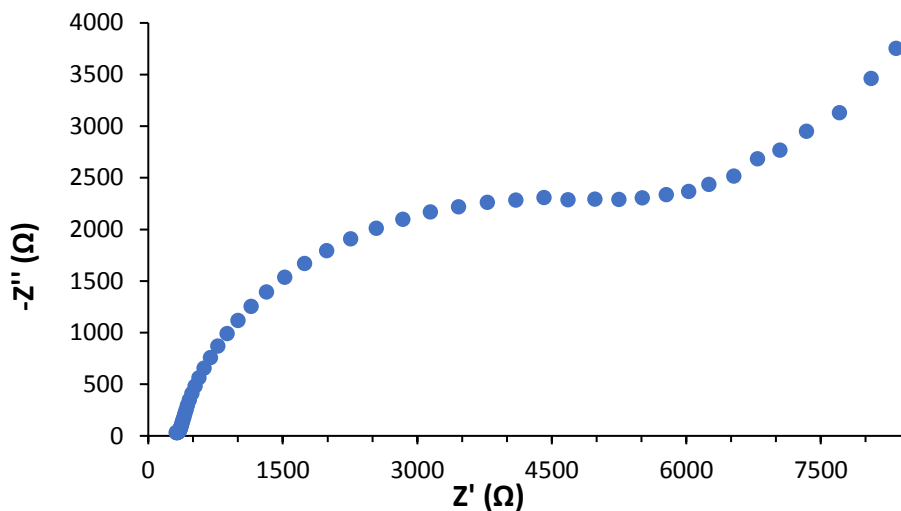
Obr. 21 - Cyklické voltamogramy pokryté elektrody před a po měření

#### 4.1.2. Elektrochemická impedanční spektroskopie

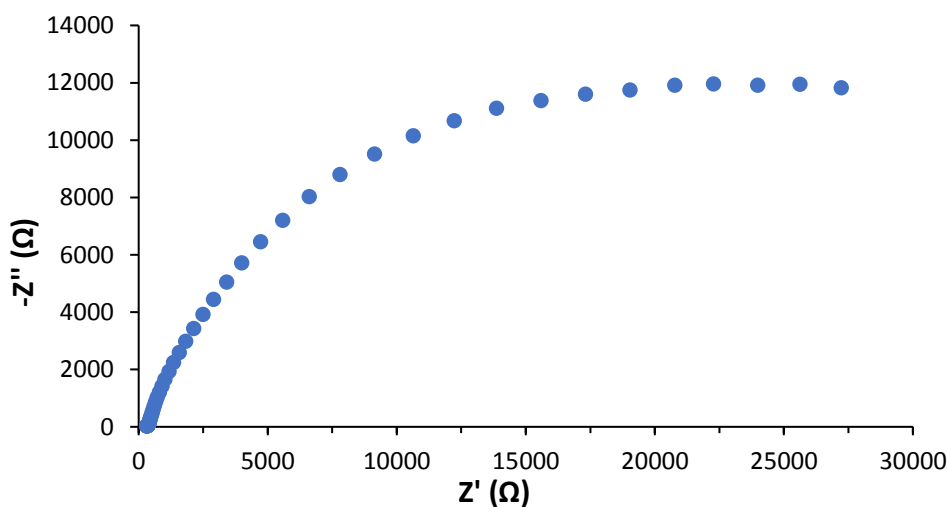
Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS) byla využita jako doplňková metoda k CV při kontrole čistoty nepokryté GCE a dále ke kontrole celistvosti fosfolipidové dvojvrstvy na povrchu GCE. Cílem těchto experimentů bylo zjištění difference naměřeného odporu mezi elektrodou modifikovanou vrstvou fosfolipidů a elektrodou čistou. Odpor modifikované elektrody by při tomto experimentu měl být větší, a to zejména z toho důvodu, že vytvořená fosfolipidová vrstva na povrchu GCE je nevodivá, tudíž zamezuje vedení elektrického proudu mezi povrchem elektrody a roztokem.

Nyquistovy grafy zaznamenané s nemodifikovanou a modifikovanou GCE lze vidět na obr. 22 a obr. 23. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí Randlesova ekvivalentního obvodu (Obr. 18) a byly vypočteny hodnoty odporu proti přenosu náboje  $R_{ct}$  a kapacity elektrické dvojvrstvy  $C_{dl}$ . Při porovnání hodnot  $R_{ct}$  si lze všimnout, že při měření s nemodifikovanou GCE dosahuje odpor proti přenosu náboje přibližně 6 k $\Omega$ , zatímco při měření s modifikovanou GCE dosahuje odpor přibližně 33 k $\Omega$ . Hodnoty  $R_{ct}$  naměřené s modifikovanou GCE jsou tedy zhruba pět a půl krát vyšší než hodnoty čisté GCE. V případě porovnání kapacity elektrické dvojvrstvy jsou hodnoty získané modifikovanou GCE opět mnohem vyšší než hodnoty získané elektrodou nemodifikovanou. Hodnota  $C_{dl}$  nemodifikované elektrody zde dosahuje přibližně 14  $\mu$ F, zatímco hodnota  $C_{dl}$  modifikované elektrody se přibližuje 27  $\mu$ F, což je zhruba dvojnásobek. Z uvedených hodnot vyplývá, že GCE byla pokryta elektricky velmi málo vodivou fosfolipidovou vrstvou s vlastnostmi dielektrika. Charakteristický polokružnicový průběh impedančního spektra modifikované elektrody bez lineární části při nízkých frekvencích ukazuje, že

fosfolipidová vrstva je kompaktní, zcela pokrývá uhlíkový substrát a brání ferrokyanidovým a ferrikyanidovým iontům v přístupu k tomuto substrátu a zamezuje tak jejich elektrodové reakci.



Obr. 22 - Nyquistův graf získaný s nemodifikovanou GCE měřením v roztoku ferrikyanidu draselného (1 mmol/l) a ferrokyanidu draselného (1 mmol/l) v NaCl (9 g/l).

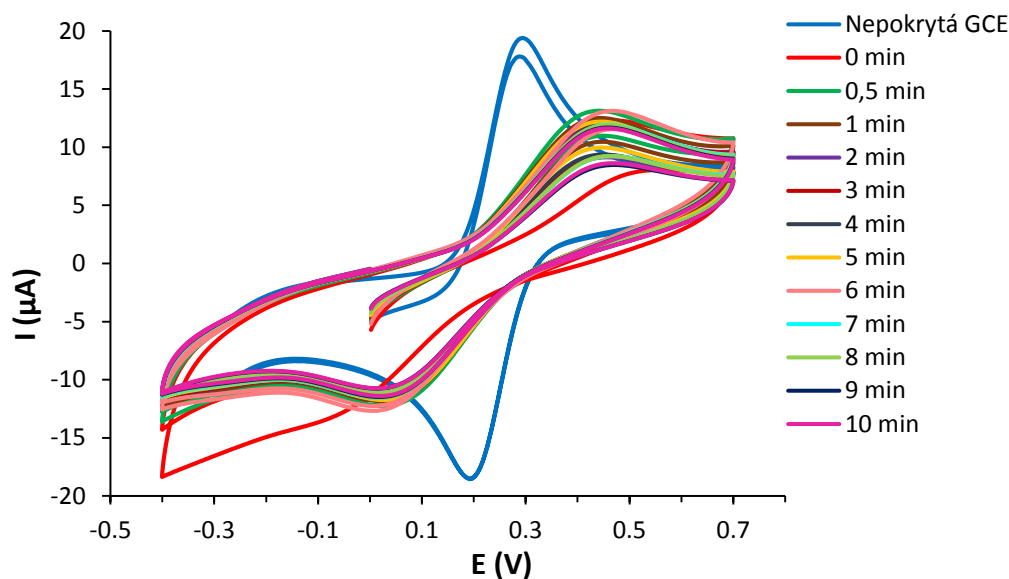


Obr. 23 - Nyquistův graf získaný s modifikovanou GCE měřením v roztoku ferrikyanidu draselného (1 mmol/l) a ferrokyanidu draselného (1 mmol/l) v NaCl (9 g/l).

## 4.2. Stabilita modelové membrány

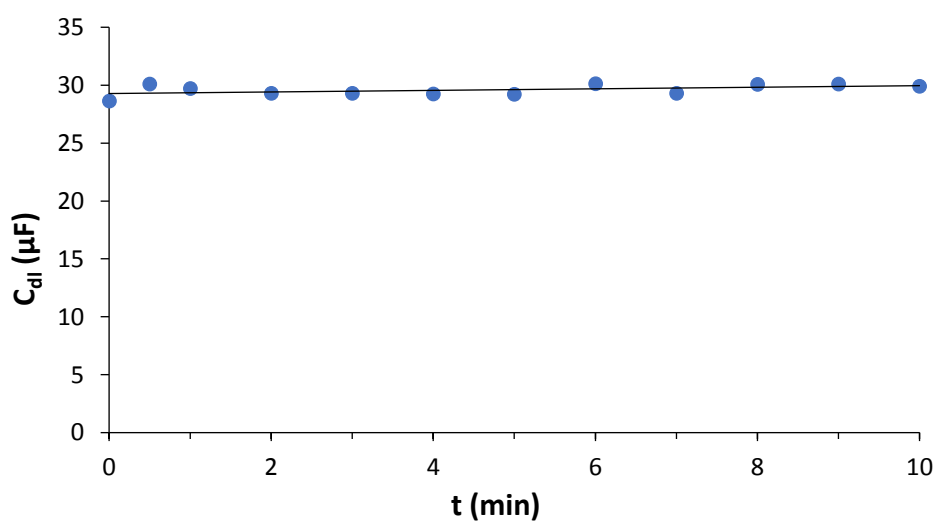
Pro zjištění stability vrstvy asolectinu na GCE ve vodě v závislosti na čase byly využity metody CV a EIS. Na výsledném grafu (Obr. 24), který zahrnuje cyklické voltamogramy zaznamenané v roztoku ferrikyanidu draselného a ferrokyanidu draselného po opakovaném ponoření modifikované elektrody na určitou dobu (od 0,5 do 10 min) do vody, lze vidět, že pouze první sken se odlišuje svým průběhem (proudovou odezvou) od dalších skenů, což ukazuje, že při něm dochází v důsledku vloženého potenciálu ke změnám

modifikovaného povrchu elektrody. Po tomto prvním skenu dojde k ustálení proudové odezvy.



Obr. 24 - Cyklické voltamogramy pokryté elektrody při testování stability vrstvy asolectinu v závislosti na čase. Měřeno v roztoku ferrikyanidu draselného (1 mmol/l) a ferrokyanidu draselného (1 mmol/l) v NaCl (9 g/l).

Stabilitu asolectinové vrstvy na povrchu GCE potvrzují i experimenty provedené metodou EIS měřením v roztoku ferrikyanidu draselného (1 mmol/l) a ferrokyanidu draselného (1 mmol/l) v NaCl (9 g/l). Na výsledném grafu (Obr. 25) hodnot získaných z Nyquistových diagramů lze vidět, že kapacita vrstvy se při opakovaném namáčení elektrody do vody na 0,5 až 10 min neměnila.



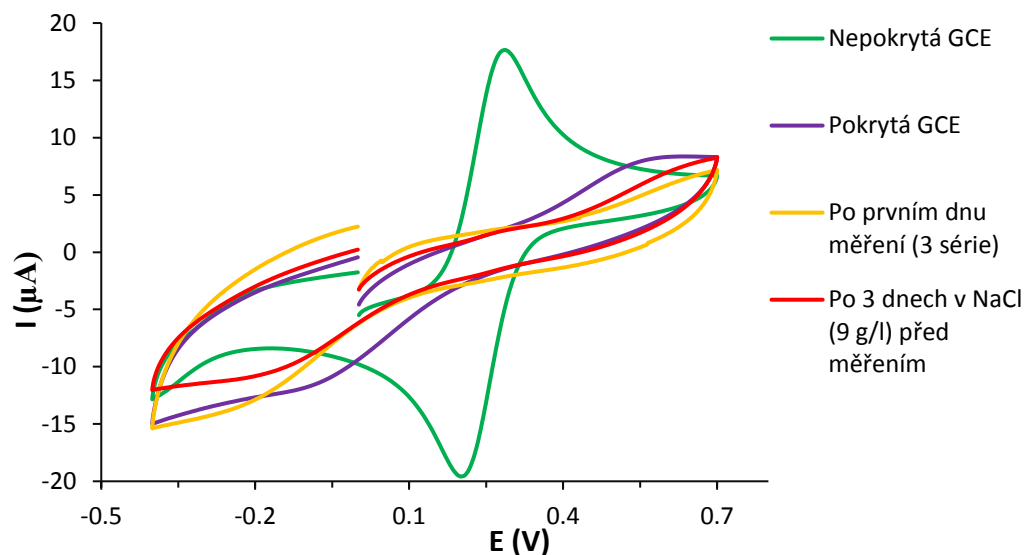
Obr. 25 – Graf závislosti kapacity asolectinové vrstvy na době ponoření elektrody ve vodě. Měřeno metodou EIS v roztoku ferrikyanidu draselného (1 mmol/l) a ferrokyanidu draselného (1 mmol/l) v NaCl (9 g/l).



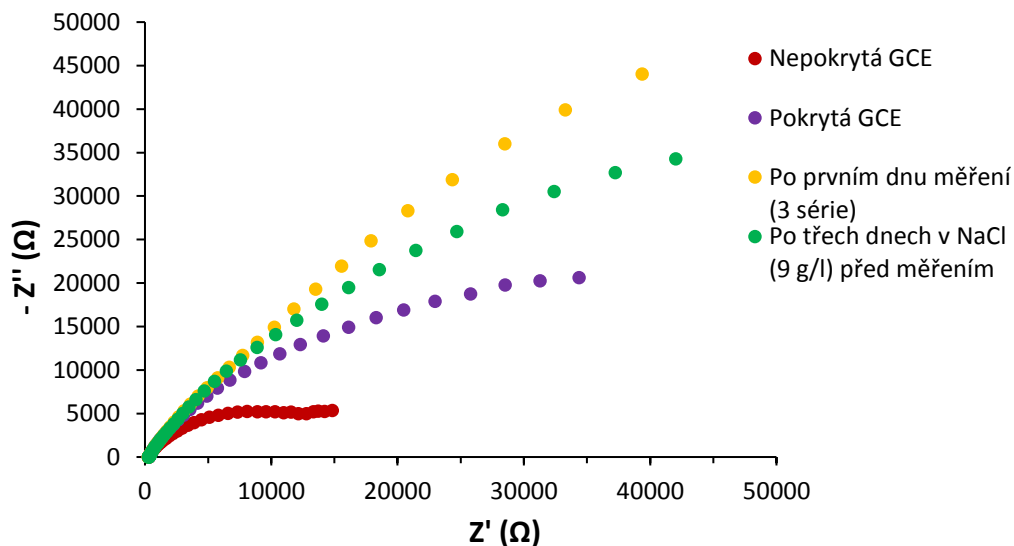
CV i EIS experimenty ukázaly, že fosfolipidová vrstva na povrchu GCE je dostatečně stabilní a nedochází k jejímu poškození (vymývání fosfolipidů) při výměně roztoku a stání ve vodném prostředí po dobu až 10 min. Doba delší než 10 min nebyla testována, neboť používání delší doby extrakční akumulace analytu z vodného roztoku vzorku do asolectinové vrstvy se nepředpokládá.

Dále byla testována stabilita fosfolipidové dvojvrstvy ponořením v roztoku NaCl (9 g/l) po dobu tří dnů. Tento experiment byl opět realizován pomocí metody CV a metody EIS měřením v roztoku ferrikyanidu draselného (1 mmol/l) a ferrokyanidu draselného (1 mmol/l) v NaCl (9 g/l). Postupně byly zaznamenány cyklické voltamogramy a Nyquistovy grafy pro nepokrytou a pokrytou elektrodu, cyklický voltamogram a Nyquistův graf získané po prvním dni měření s vytvořenou fosfolipidovou dvojvrstvou, kdy bylo provedeno měření tří sérií experimentů s roztokem FES. Dále byl zaznamenán voltamogram a Nyquistův graf po třech dnech ponechání GCE v roztoku NaCl (9 g/l).

Na následujících grafech pro metody CV (Obr. 26) a EIS (Obr. 27) lze vidět, že po pokrytí elektrody došlo k poklesu oxidačně-redukčních píků ferro-/ferrikyanidu a zároveň nárůstu odporu proti přenosu elektronů (polarizační rezistance). Po prvním dnu používání vrstvy k opakované extrakci a oxidaci FES poté došlo ke zvětšení polarizační rezistance na přibližně dvojnásobnou hodnotu nejspíše z důvodu inkorporace FES a/nebo jeho oxidačních produktů do vrstvy. Po třech dnech ponechání GCE v roztoku NaCl (9 g/l) došlo pouze k nepatrné změně tvaru cyklického voltamogramu a zároveň ke snížení hodnot polarizační rezistance. Lze tak z obou grafů vyčíst, že došlo nejspíše k mírnému vymytí FES a produktů jeho oxidace z fosfolipidové vrstvy. Její celistvost zůstala zachována i po 3 dnech. Hodnoty  $R_{ct}$  a  $C_{dl}$  získané vyhodnocením EIS dat pomocí Randlesova ekvivalentního obvodu jsou uvedeny v Tab. I.



Obr. 26 - Cyklické voltamogramy GCE při testování stability vrstvy asolectinu. Měřeno v roztoku ferrikyanidu draselného (1 mmol/l) a ferrokyanidu draselného (1 mmol/l) v NaCl (9 g/l).



Obr. 27 - Nyquistovy grafy GCE při měření stability vrstvy asolectinu. Měřeno v roztoku ferrikyanidu draselného (1 mmol/l) a ferrokyanidu draselného (1 mmol/l) v NaCl (9 g/l).

Tab. I – Naměřené hodnoty  $R_{ct}$  a  $C_{dl}$  při měření stability vrstvy asolectinu

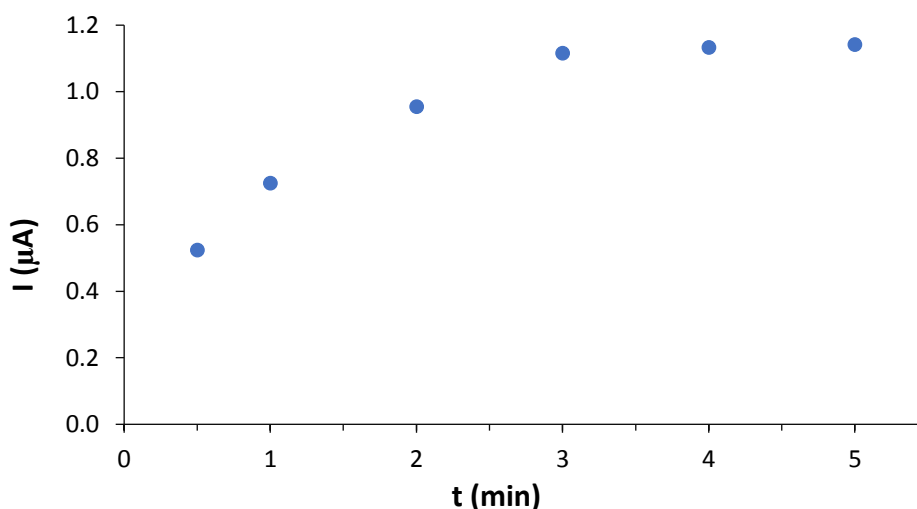
Měření	$R_{ct}$ (k $\Omega$ )	$C_{dl}$ ( $\mu$ F)
Nepokrytá GCE	15,6	21
Pokrytá GCE	47,2	31
Po prvním dnu měření (3 série)	100,6	32
Po třech dnech v NaCl (9 g/l) před měřením	85,5	37

### 4.3. Akumulace analytu

Akumulace analytu jak na povrchu čisté, nepokryté elektrody, tak ve vytvořené fosfolipidové dvojvrstvě na povrchu GCE byla měřena metodou diferenční pulsní voltametrie. Záměrem tohoto experimentu bylo zjistit, zda dochází k adsorpci antimuskarinik na povrch pracovní elektrody, eventuálně k extrakci do připravené fosfolipidové membrány.

#### 4.3.1. Tolterodin

Akumulace tolterodinu v závislosti na čase byla měřena pouze na nepokryté GCE transferovou technikou. K experimentu byl využit roztok tolterodinu o koncentraci  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Průběh adsorpce TOL na nepokryté elektrodě lze vidět na obr. 28. Z grafu lze vidět, že až do třetí minuty se s přibývajícím časem akumulace zároveň zvyšovala proudová odezva. Po dosažení tohoto času došlo nejspíše k nasycení povrchu elektrody analytem. Proudová odezva po tomto čase zůstala víceméně konstantní. Jednotlivé výsledné voltamogramy pro adsorpci tolterodinu na nepokryté GCE lze vidět v grafu v příloze 1. Experiment prokázal, že TOL je schopen adsorbovat se na povrch GCE.

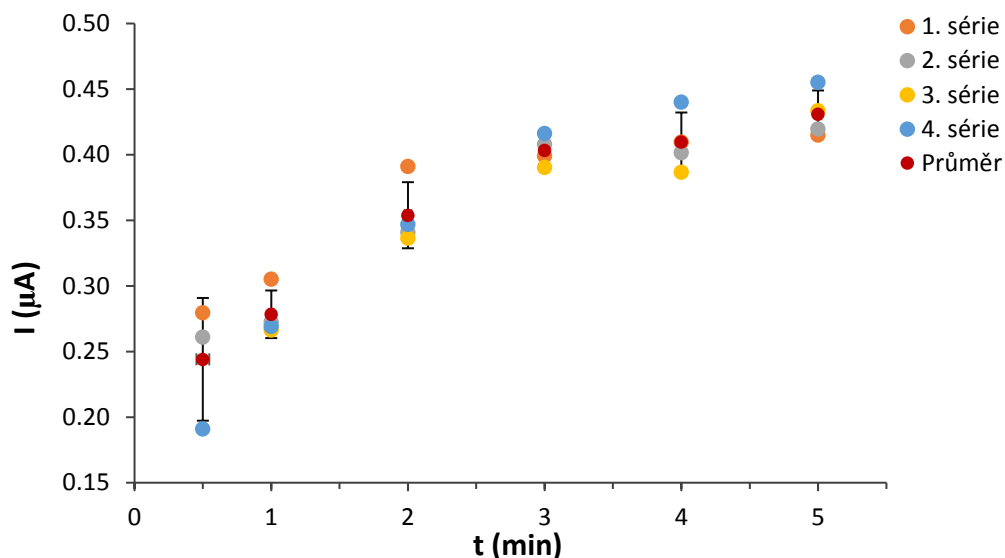


Obr. 28 - Průběh adsorpce TOL na nepokryté elektrodě. Měřeno metodou DPV.

#### 4.3.2. Fesoterodin

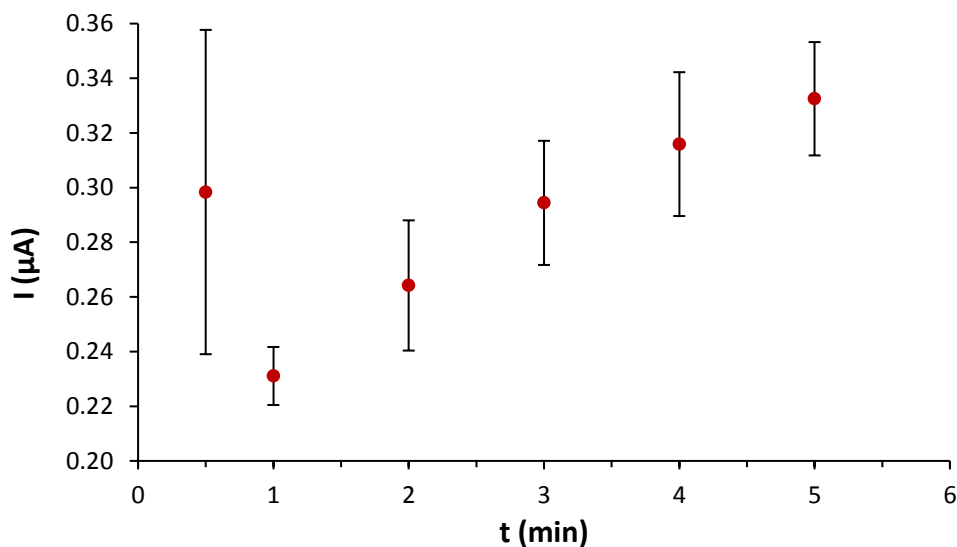
Akumulace fesoterodinu v závislosti na čase byla měřena jak na nepokryté, tak na pokryté GCE transferovou technikou. Při obou těchto experimentech byl využit roztok fesoterodinu o koncentraci  $2 \cdot 10^{-4}$  mmol/l. Průběh adsorpce FES na nepokryté elektrodě lze vidět na obr. 29. Celkem byly provedeny čtyři série měření, které jsou v tomto grafu zaznamenány společně s celkovým průměrem. Z průběhu grafu lze vyčíst, že proudová

odezva se lineárně zvyšovala do druhé minuty experimentu. Poté došlo k odchýlení od linearity.



Obr. 29 - Průběh adsorpce FES na nepokryté elektrodě. Měřeno metodou DPV.

Na obr. 30 lze vidět průběh akumulace analytu FES na pokryté elektrodě. Celkem byly provedeny dvě série měření, které byly zprůměrovány. Z průběhu grafu lze vyčíst, že s rostoucí dobou akumulace se lineárně zvyšovala proudová odezva. Výjimkou je proudová odezva v čase 0,5 min. Tato hodnota odpovídá prvnímu skenu, během kterého nejspíše došlo v důsledku vloženého potenciálu ke změnám modifikovaného povrchu elektrody. Tomu nasvědčuje i odlišný průběh příslušné voltametrické křivky. Voltamogramy získané měřením adsorpce FES na pokryté elektrodě metodou DPV jsou zobrazeny v příloze 2.

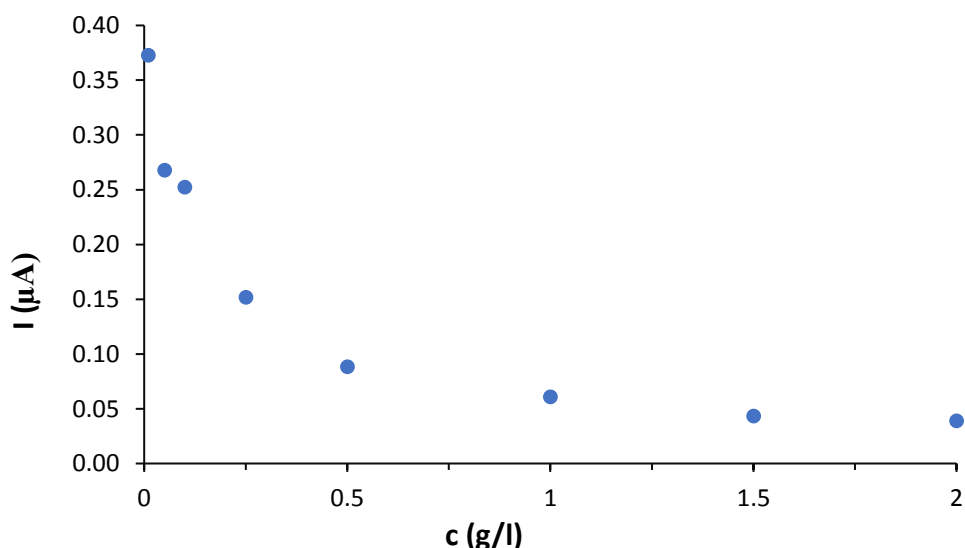


Obr. 30 - Průběh adsorpce FES na pokryté elektrodě v závislosti na čase. Měřeno metodou DPV.

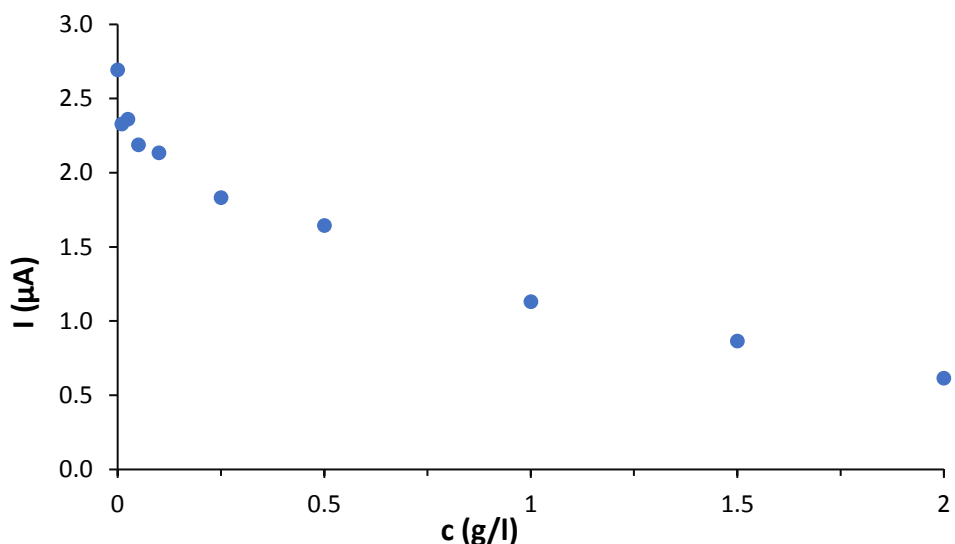
## 4.4. Interakce asolectinu a antimuskarinik

### 4.4.1. Tolterodin

Při studování interakce asolectinu a TOL byly použity roztoky tohoto antimuskarinika o koncentraci 1 mmol/l a 2 mmol/l. Na výsledném grafu pro 1 mmol/l roztok TOL (Obr. 31) lze vidět, že při zvyšování koncentrace asolectinu v roztoku v měrné cele obsahující ZE a roztok TOL o dané koncentraci, docházelo k prudkému, nelineárnímu snižování proudové odezvy vlivem konkurenční adsorpce asolectinu na povrch elektrody, který byl touto vznikající vrstvou asolectinu blokován. Dalším faktem je, že asolectin je schopný již při koncentraci 1 g/l vytvářet liposomy [31], které na elektrodě mohou vytvářet film. TOL se do těchto vzniklých liposomů může extrahovat a z tohoto důvodu může být jeho proudová odezva v roztoku obsahujícím liposomy nízká a prakticky se nemění s dalšími přídávky asolectinu. Na Obr. 32 lze vidět, že při experimentu s roztokem TOL o koncentraci 2 mmol/l došlo ke změně závislosti proudové odezvy na koncentraci asolectinu. V tomto případě docházelo k pomalejšímu poklesu proudové odezvy TOL, což potvrzuje konkurenční adsorpci obou látek na elektroodovém povrchu při koncentraci TOL vyšší, než je kritická liposomální koncentrace asolectinu (1 g/l odpovídá zhruba koncentraci sójového lecitinu 1,3 mmol/l). Voltamogramy získané měřením interakce asolectinu a roztoku TOL o koncentraci 2 mmol/l metodou DPV s využitím nepokryté elektrody jsou zobrazeny v příloze 3.



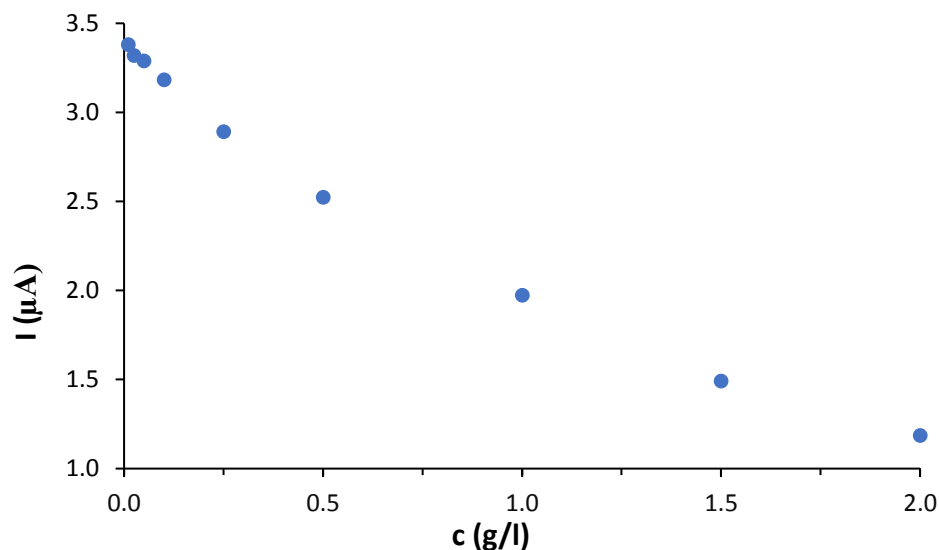
Obr. 31 – Interakce asolectinu s roztokem TOL o koncentraci 1 mmol/l.



Obr. 32 - Interakce asolectinu s roztokem TOL o koncentraci 2 mmol/l.

#### 4.4.2. Fesoterodin

Při studování interakce asolectinu a FES byl použit 2 mmol/l roztok tohoto antimuskarinika. Na obr. 33 lze vidět výslednou závislost proudové odezvy FES na koncentraci asolectinu. V porovnání se závislostí získanou při experimentu sledujícím interakci asolectinu s roztokem TOL o koncentraci 2 mmol/l lze vidět, že v případě roztoku FES o stejné koncentraci dochází k navýšení proudové odezvy. Získaná závislost se také více přibližuje lineárnímu průběhu, což může svědčit o silnější konkurenční adsorpci FES na elektrodový povrch oproti TOL. Větší schopnost adsorpce FES je v souladu s jeho větší lipofilitou, větší molární hmotností a také větším molárním objemem v porovnání s TOL. Detailní voltamogramy získané měřením interakce asolectinu a roztoku FES o koncentraci 2 mmol/l metodou DPV s využitím nepokryté elektrody jsou zobrazeny v příloze 4.



Obr. 33 - Interakce asolectinu s roztokem FES o koncentraci 2 mmol/l.

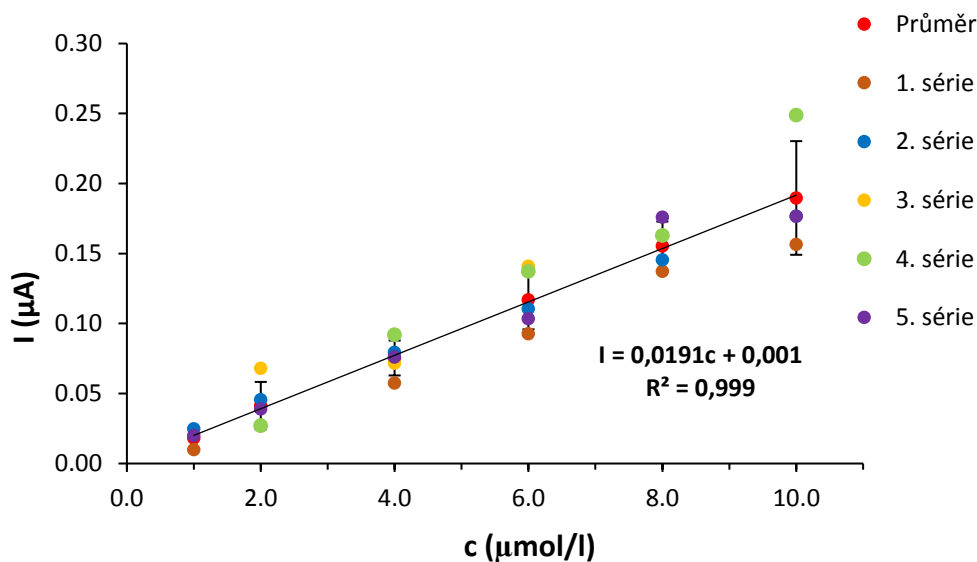
## 4.5. Kalibrační závislosti

### 4.5.1. Tolterodin

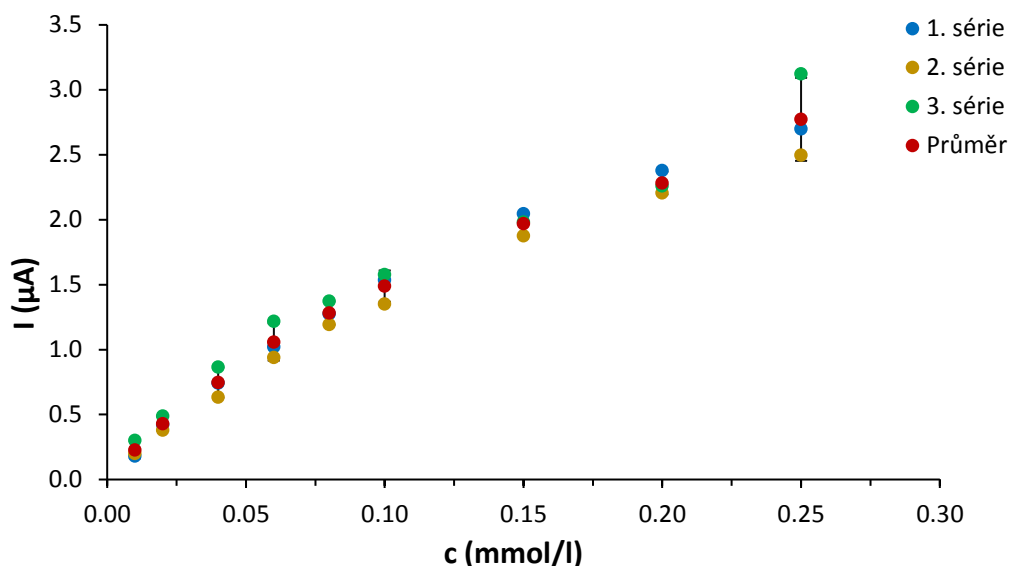
Kalibrační řada tolterodinu s využitím nepokryté elektrody byla měřena zvlášť pro nižší koncentrace, v rozmezí  $1 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l a zvlášť pro koncentrace vyšší, v rozmezí  $1,5 \cdot 10^{-5}$  až  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Všechna měření byla provedena metodou DPV.

Kalibrační závislost TOL s využitím nepokryté elektrody při nižších koncentracích (Obr. 34) byla sestavena z průměru celkově pěti sérií měření. Z výsledného grafu lze vidět, že při těchto nižších koncentracích je kalibrační závislost TOL s využitím nepokryté elektrody lineární v celém rozsahu. Hodnota koeficientu determinace u této závislosti dosahuje hodnoty 0,999. Lze si ale také povšimnout, že s rostoucí koncentrací TOL v roztoku pomalu narůstá směrodatná odchylka měřeného proudového signálu.

Kalibrační závislost TOL s využitím nepokryté elektrody při vyšších koncentracích (Obr. 35) byla sestavena z průměru celkem tří sérií měření. Z výsledného grafu lze vidět, že při vyšších koncentracích TOL již není kalibrační závislost s využitím nepokryté GCE lineární, ale dochází k jejímu zakřivení. To je pravděpodobně důsledkem nasycení elektrodového povrchu adsorbovanými molekulami TOL.



Obr. 34 - Kalibrační závislost TOL s využitím nepokryté elektrody pro koncentrace  $1 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Měřeno metodou DPV.



Obr. 35 - Kalibrační závislost TOL s využitím nepokryté elektrody pro koncentrace  $1 \cdot 10^{-5}$  až  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Měřeno metodou DPV.

Kalibrační závislost TOL s využitím modifikované GCE byla měřena metodou DPV pro koncentrace v rozmezí  $1 \cdot 10^{-5}$  až  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol/l transferovou technikou s dobou akumulace 5 min. Při tomto experimentu však proud píku s rostoucí koncentrací TOL v roztoku místo nárůstu klesal v důsledku pasivace elektrody produkty oxidace fenolového kruhu TOL za vzniku dimerních, resp. oligomerních produktů. Mechanismus tvorby těchto produktů je znázorněn na obr. 12 v teoretické části této práce. Voltamogramy pro kalibrační závislost TOL s využitím modifikované GCE lze vidět v příloze 5.

#### 4.5.2. Fesoterodin

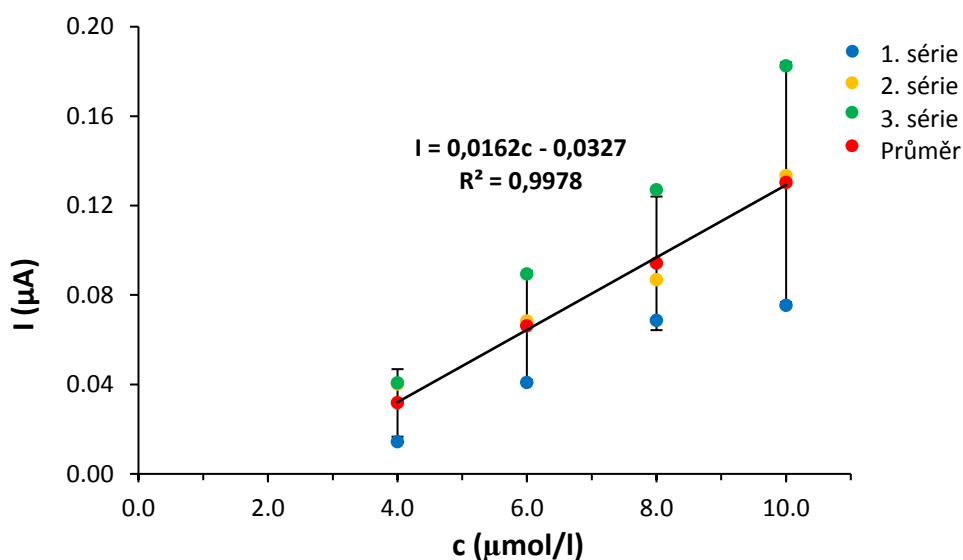
Kalibrační závislost pro FES s využitím nepokryté elektrody byla taktéž měřena zvlášť pro nižší koncentrace, v rozmezí  $1 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l a zvlášť pro koncentrace vyšší, v rozmezí  $1,5 \cdot 10^{-5}$  až  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Všechna měření byla provedena metodou DPV.

Při prvním pokusu o sestrojení kalibrační závislosti FES při nižších koncentracích byly provedeny tři série měření, které lze vidět na obr. 36. Z grafu je patrné, že při koncentracích  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l a  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/l se na výsledném voltamogramu nevyskytoval pík, který by bylo možné vyhodnotit. Z tohoto důvodu bylo experimentálně zjišťováno, zda by bylo možné využít k zesílení proudového signálu při nízkých koncentracích FES jeho akumulace na elektrodovém povrchu. Proto byly hledány vhodné parametry – potenciál akumulace a doba akumulace. Výsledný graf pro zjištění nejlepší hodnoty nastaveného potenciálu je zobrazen v příloze 6. Graf byl sestaven z průměru tří sérií měření. Jako nejvhodnější hodnota potenciálu byla vyhodnocena hodnota 450 mV. V příloze 7 je poté

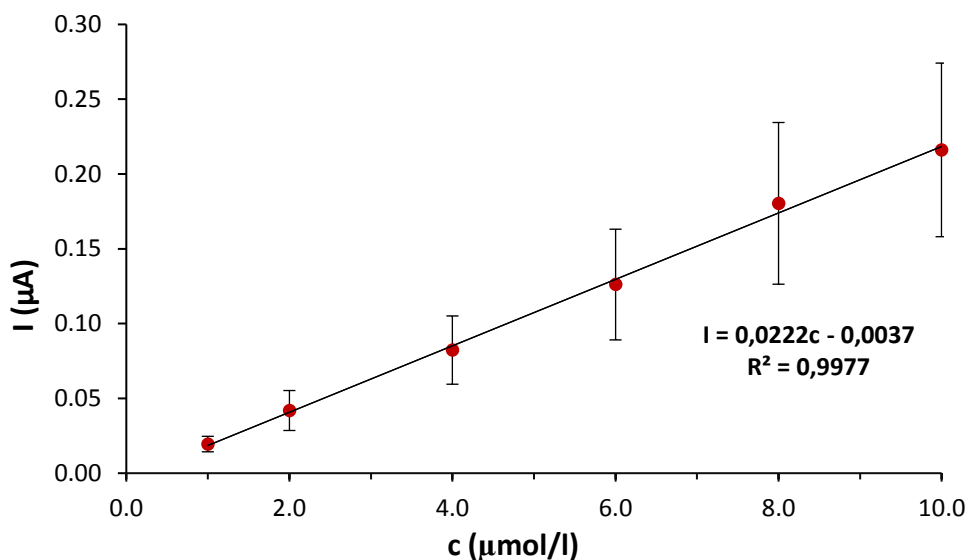


zobrazen výsledný graf pro zjištění nejlepší doby akumulace. Tento graf byl sestaven z průměru čtyř sérií měření. K tomuto experimentu byl využit roztok FES o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Jako nejvhodnější doba akumulace byl vyhodnocen časový interval 30 s.

Tyto experimentálně zjištěné parametry potenciálu a doby akumulace byly následně využity k novému měření kalibrační závislosti FES s využitím nepokryté elektrody pro nižší koncentrace. Na výsledném grafu (Obr. 37) lze vidět, že zjištěné parametry pomohly ke zvýšení citlivosti metody měření (hodnota směrnice kalibrační přímky se zvýšila z  $0,0162 \mu\text{A} \cdot \text{l}/\mu\text{mol}$  na  $0,0222 \mu\text{A} \cdot \text{l}/\mu\text{mol}$ ) a byly zaznamenány i hodnoty proudové odezvy píků při koncentracích  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l a  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Kalibrační závislost byla sestavena z průměru tří sérií, kdy každá série zahrnovala dvě měření. Výsledná závislost měla lineární průběh s hodnotou koeficientu determinace  $R^2 = 0,9977$ .

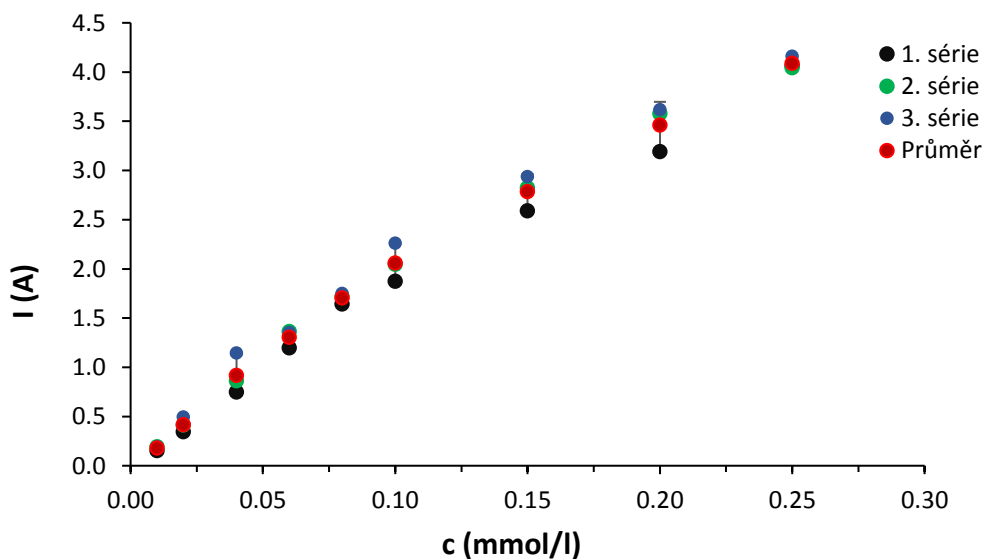


Obr. 36 - Kalibrační závislost FES s využitím nepokryté elektrody pro koncentrace  $1 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Měřeno metodou DPV



Obr. 37 - Kalibrační závislost FES s využitím nepokryté elektrody pro koncentrace  $1 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l při nejlepších zjištěných hodnotách potenciálu akumulace 450 mV a doby akumulace 30 s. Měřeno metodou DPV.

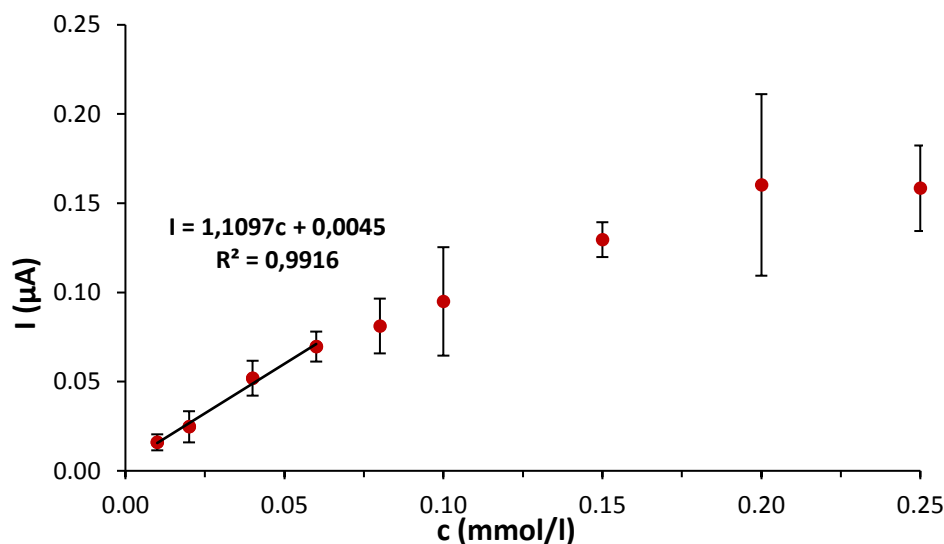
Kalibrační závislost FES s využitím nepokryté GCE pro vyšší koncentrace (Obr. 38) byla sestavena z průměru tří sérií měření. Z výsledné závislosti lze vidět, že při vyšších koncentracích FES dochází k mírnému zakřivení kalibrační křivky z důvodu adsorpce FES na povrch GCE.



Obr. 38 - Kalibrační závislost FES s využitím nepokryté elektrody pro koncentrace  $1 \cdot 10^{-5}$  až  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Měřeno metodou DPV.

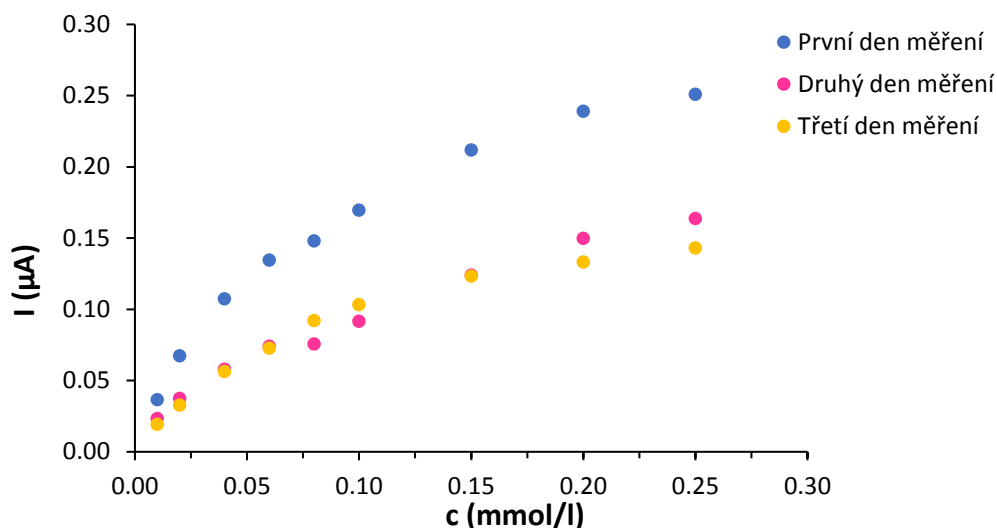
Kalibrační závislost FES s využitím pokryté elektrody byla měřena metodou DPV transferovou technikou s dobou extrakce v roztocích FES dané koncentrace po dobu 1 min a 5 min. Obě měření byla provedena metodou DPV pro rozsah koncentrací  $1 \cdot 10^{-5}$  až  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol/l.

Kalibrační závislost měřená transferovou metodou v roztocích dané koncentrace po dobu 1 min (Obr. 39) byla sestrojena z průměru čtyř měření. Všechna tato měření byla prováděna s využitím téže připravené fosfolipidové vrstvy na povrchu GCE. Výsledný průběh kalibrační závislosti na pokryté elektrodě pro dobu akumulace jedné minuty je lineární pouze pro koncentrace 10–60  $\mu\text{mol/l}$ . Pro vyšší koncentrace je nelineární.



Obr. 39 – Kalibrační závislost FES s využitím asolectinovou vrstvou modifikované GCE měřená metodou DPV transferovou technikou po extrakci z roztoků dané koncentrace po dobu 1 min.

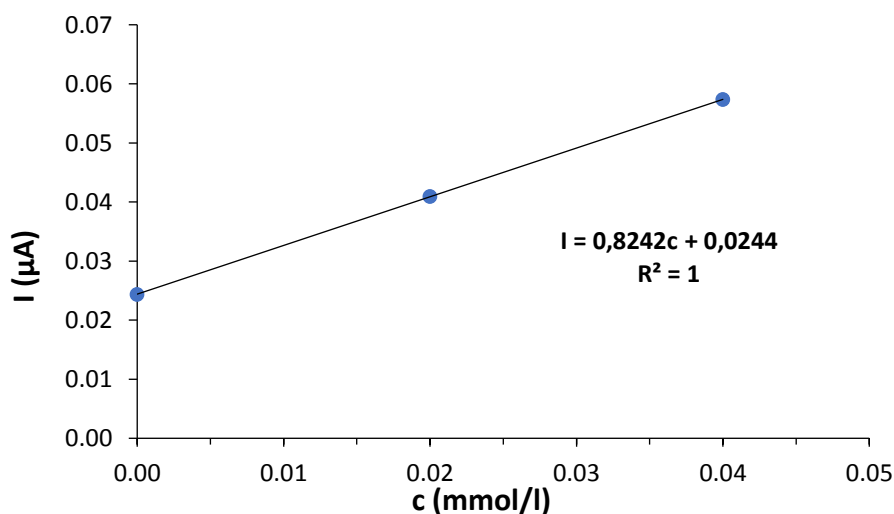
Kalibrační závislost měřená transferovou metodou po extrakci FES do asolectinové vrstvy z roztoků dané koncentrace po dobu 5 min (Obr. 40) byla měřena během tří dnů. První den byla provedena jedna sérii měření, druhý den byly provedeny tři série měření a třetí den byla provedena opět jedna série měření. Mezi jednotlivými dny experimentů byla modifikovaná elektroda ponechána v roztoku NaCl (9 g/l). Ve výsledném grafu jsou zaznamenány hodnoty proudové odezvy získané v jednotlivých dnech, hodnoty druhého dne měření jsou v této grafické závislosti vyneseny jako průměr všech tří měření. Z grafu je patrné, že při akumulaci po dobu pěti minut byla první den proudová odezva vyšší než při akumulaci po dobu jedné minuty. Zbylé dny měření došlo k poklesu této proudové odezvy nejspíše z důvodu inkorporace oxidačních produktů FES do asolectinové vrstvy. Výsledný celkový průběh kalibrační závislosti pokryté elektrody pro dobu akumulace pěti minut má stejně jako v předchozím případě nelineární charakter. Lineární úsek lze nalézt pouze pro koncentrační rozsah do  $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l.



Obr. 40 - Kalibrační závislost FES s využitím asolectinem modifikované GCE měřená transferovou metodou DPV po extrakci z roztoků dané koncentrace po dobu 5 min během tří dnů.

#### 4.6. Stanovení FES ve vzorku moči

Pro tento experiment byl vzorek moči pro tento experiment, představující reálnou matici, poskytnut zdravou, mladou ženou bez příjmu jakýchkoliv léků včetně hormonální antikoncepce. Experiment byl proveden metodou standardního přídavku roztoku FES o výsledné koncentraci  $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l v moči. Při experimentu byla využita asolectinem modifikovaná GCE. Jednotlivá měření byla prováděná transferovou metodou po extrakci FES ze vzorku moči do fosfolipidové vrstvy na elektrodě po dobu 5 min. Výslednou závislost, jež má lineární charakter, sestavenou z proudových odezev modelového vzorku a jednotlivých přídavků lze vidět na obr. 41. Po dosažení hodnoty proudové odezvy zředěného vzorku moči s FES do rovnice přímky zjištěné z této závislosti byla vypočítána koncentrace roztoku FES  $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l, což představuje 100% výtěžek analytu.



Obr. 41 - Stanovení FES ve vzorku moči metodou standardního přídavku.

## 5. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo sledování interakcí vybraných antimuskarinových léčiv - tolterodinu a fesoterodinu – s uměle připravenou biologickou membránou a testování možnosti jejího využití pro stanovení léčiv metodou extrakční voltametrie. Modelová biomimetická membrána byla připravena na povrchu elektrody ze skelného uhlíku ze směsi fosfolipidů izolovaných ze sójových bobů - asolectinu. S využitím cyklické voltametrie a elektrochemické impedanční spektroskopie bylo dokázáno, že připravená fosfolipidová vrstva je celistvá, při výměně roztoku nedochází k jejímu poškození a je dostatečně stabilní po dobu nejméně 3 dní i při opakovaném použití pro extrakci a voltametrickou analýzu fesoterodinu.

Experimenty ukázaly, že jak v případě TOL, tak v případě FES, docházelo k adsorpci těchto antimuskarinik na povrch nepokryté elektrody. Při měřeních s pokrytou elektrodou se FES prekoncentroval a bylo možné jej po extrakci stanovit v připravené fosfolipidové vrstvě. Při experimentech FES poskytoval analyticky využitelný signál pro transferovou diferenčně pulsní voltametrickou techniku, která umožňuje selektivní izolaci analytu i ze složitější matrice vzorku jako je například moč a jeho stanovení v čistém elektrolytu vhodného složení bez přítomnosti interferujících složek matrice.

TOL se při měřeních s pokrytou elektrodou stejně jako FES extrahoval do připravené vrstvy, ale při jeho elektrochemické oxidaci vznikaly produkty, které pasivovaly povrch elektrody a znemožňovaly tak provedení analýzy.

## 6. Summary

The aim of this bachelor thesis was the observation of chosen antimuscarinic drugs - tolterodine and fesoterodine - and their interactions with artificially prepared biological membrane and the testing of its use for analysis of these drugs using the extraction voltammetry method. The model biomimetic membrane was prepared on the glassy carbon electrode surface using the asolectin phospholipid made from soybeans. With the use of cyclic voltammetry and the electrochemical impedance spectroscopy it was proven that the prepared phospholipid membrane is covering the whole electrode surface, it is not damaged during solution exchange and it is stable in the course of a least three days even after repeated use for extraction and voltammetric analysis of fesoterodine.

The experiments have proven that both tolterodine and fesoterodine were also adsorbed on the unmodified electrode surface. Using the modified electrode, it was possible to preconcentrate and analyse the fesoterodine right in the phospholipid layer. The fesoterodine has provided analytically useful signal for the transfer differential pulse voltammetry method, which allows the selective isolation of the analyte from complex sample matrix, for example urine, and its analysis in the clean electrolyte solution without the interfering matrix components.

Tolterodine, just like the fesoterodine, was able to be extracted to the phospholipid layer. However, his electrochemical oxidation led to products, which passivated the electrode surface, disrupting the analysis.

## Seznam literatury

- [1] K. Nováková, Modelové biologické membrány: jejich charakterizace a využití, *Chem. Listy* 109 (2015) 166–175.
- [2] B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Základy buněčné biologie*, 2. ed., Espero Publishing, Ústí nad Labem, 1998.
- [3] R. Murray, D.A. Bender, K.M. Botham, P.J. Kennelly, V.W. Rodwell, P.A. Weil, *Harperova ilustrovaná biochemie*, Galén, Praha 2012.
- [4] V. Müllerová, Modifikace uhlíkových vláknových elektrod fosfolipidy, bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2018.
- [5] M. Ledvina, A. Stoklasová, J. Cerman, *Biochemie pro studující medicíny*, Karolinum, Praha 2004.
- [6] M. Megová, Studium liposomů jako modelů biomembrán, bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2006.
- [7] K.M. Chang, M.R.R. de Planque, K.P. Zauner, Towards Functional Droplet Architectures: a Belousov-Zhabotinsky Medium for Networks, *Scientific Reports* 8 (2018).
- [8] S. Khadke, P. Stone, A. Rozhin, J. Kroonen, Y. Perrie, Point of use production of liposomal solubilised products, *International Journal of Pharmaceutics* 537 (2018) 1–8.
- [9] J. Genova, M. Petrov, I. Bivas, P. Rafailov, H. Naradikian, B. Katranchev, Fourier-transform infrared and Raman characterization of bilayer membranes of the phospholipid SOPC and its mixtures with cholesterol, *Colloids and Surfaces A* 557 (2018) 85–93.
- [10] E. Salnikov, B. Drung, G. Fabre, A. Itkin, M. Otyepka, N.A. Dencher, B. Schmidt, T. Hauß, P. Trouillas, B. Bechinger, Lipid bilayer position and orientation of novel carprofens, modulators of  $\gamma$ -secretase in Alzheimer's disease, *BBA-Biomembranes* 1860 (2018) 2224–2233.
- [11] Y. Matam, B.D. Ray, H.I. Petrache, Direct affinity of dopamine to lipid membranes investigated by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, *Neuroscience Letters* 618 (2016) 104–109.
- [12] M. Kruszewski, M. Kusaczuk, J. Kotyńska, M. Gál, R. Krętowski, M. Cechowska-Pasko, M. Naumowicz, The effect of quercetin on the electrical properties of model lipid membranes and human glioblastoma cells, *Bioelectrochemistry* 124 (2018) 133–141.
- [13] C.M. Rosetti, A. Mangiarotti, N. Wilke, Sizes of lipid domains: What do we know from artificial lipid membranes? What are the possible shared features with membrane rafts in cells?, *Biochimica et Biophysica Acta* 1859 (2017) 789–802.
- [14] Ch.G. Siontorou, G.P. Nikoleli, D.P. Nikolelis, S.K. Karapetis, Artificial Lipid Membranes: Past, Present, and Future, *Membranes* 7 (2017) č. článku 38.

- [15] R.S. Ries, H. Choi, R. Blunck, F. Bezanilla, J.R. Heath, Black Lipid Membranes: Visualizing the Structure, Dynamics, and Substrate Dependence of Membranes, *Journal of Physical Chemistry B* 108 (2004) 16040-16049.
- [16] P.L. Yeagle, Chapter 6 - Laboratory Membrane Systems, *The Membranes of Cells*, 3rd ed., University of Connecticut, Storrs, CT, USA (2016) 95-114.
- [17] J.A.Cohen, B. Gabriel, J. Teissié, M. Winterhalter, Chapter 31 - Transmembrane voltage sensor, *Membrane Science and Technology* 7 (2003) 847-886.
- [18] Y. Muto, K. Kawai, Ion Permeability Induced in Planar Lipid Bilayer Membranes by Quinone Pigments Derived from Eukaryotic Microorganisms, *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* 1 (2005) 121-157.
- [19] Y. Matsuno, C. Osono, A. Hirano, M. Sugawara, Single-Channel Recordings of Gramicidin at Agarose-Supported Bilayer Lipid Membranes Formed by the Tip-Dip and Painting Methods, *Analytical Science* 20 (2004) 1217-1221.
- [20] M. Zagnoni, Miniaturised technologies for the development of artificial lipid bilayer systems, *Lab on a Chip* 12 (2012) 1026-1039.
- [21] K. Anzai, K. Ogawa, T. Ozawa, H. Yamamoto, Quantitative comparison of two types of planar lipid bilayers—folded and painted—with respect to fusion with vesicles, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 48 (2001) 283-291.
- [22] W. Hanke, W.R. Schlue, CHAPTER FIVE – Methods for making planar lipid bilayers, *Planar Lipid Bilayers - Methods and Applications* (1993) 60-78.
- [23] M. Montal, P. Mueller, Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69 (1972) 3561-3566.
- [24] L.K. Tamm, H.M. McConnell, Supported Phospholipid Bilayers, *Biophysical Journal* 47 (1985) 105-113.
- [25] E.T. Castellana, P.S. Cremer, Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design, *Surface Science Reports* 61 (2006) 429-444.
- [26] Z. Ma, P.A. Janmey, K.A. Sharp, T.H. Finkel, Improved Method of Preparation of Supported Planar Lipid Bilayers as Artificial Membranes for Antigen Presentation, *Microscopy Research and Technique* 74 (2011) 1174-1185.
- [27] J. Andersson, I. Köper, W. Knoll, Tethered Membrane Architectures-Design and Application, *Frontiers in Materials* 5 (2018) 1-11.
- [28] S. Rebaud, O. Maniti, A.P. Girard-Egrot, Tethered bilayer lipid membranes (tBLMs): Interest and applications for biological membrane investigations, *Biochimie* 107 (2014) 135-142.
- [29] B. Raguse, V. Braach-Maksvytis, B.A. Cornell, L.G. King, P.D.J. Osman, R.J. Pace, L. Wiczorek, Tethered Lipid Bilayer Membranes: Formation and Ionic Reservoir Characterization, *Langmuir* 14 (1998) 648-659.



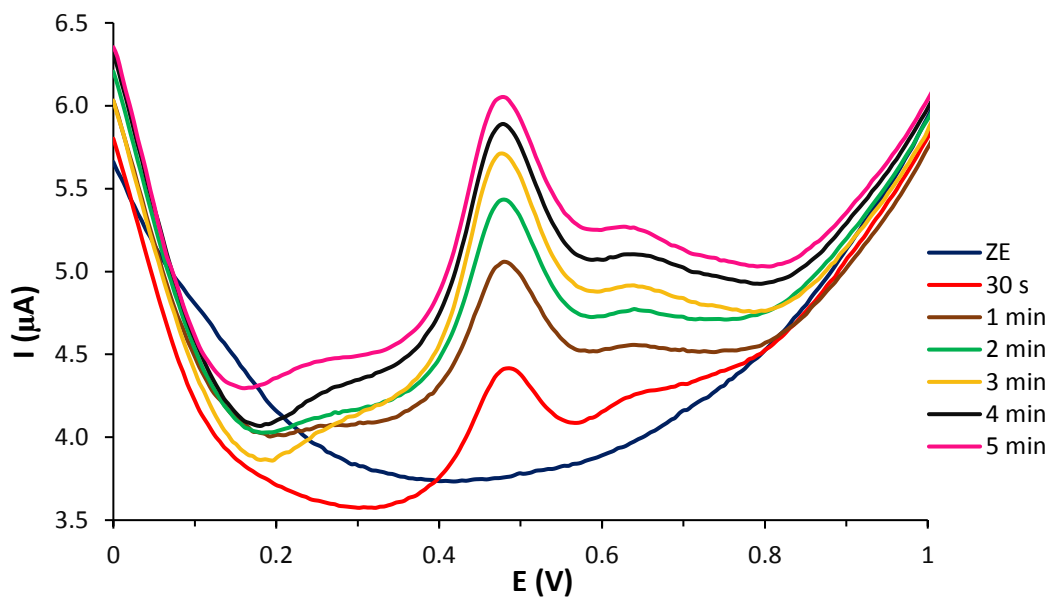
- [30] H. Švecová, J. Součková, J. Skopalová, Studium agregace fosfolipidových molekul, *Chemické listy* 105 (2011) 73-75.
- [31] J. Součková, Studium Liposomů Fyzikálně-chemickými Metodami, disertační práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2011.
- [32] H. Švecová, Studium agregace fosfolipidových molekul, diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2011.
- [33] N. Košutić-Hulita, M. Žegarac, Tolterodinium (+)-(2R,3R)-hydrogen tartrate, *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications* 61 (2005) o171-o173.
- [34] V. Saxena, Z. Zaheer, M. Farooqui, Stability-indicating HPLC determination of tolterodinu tartrate in pharmaceutical dosage form, *Indian Journal of Chemical Technology* 13 (2006) 242-246.
- [35] F. Ulgheri, M. Marchetti, O. Piccolo, Enantioselective Synthesis of (S)- and (R)- Tolterodine by Asymmetric Hydrogenation of a Coumarin Derivative Obtained by a Heck Reaction, *The Journal of Organic Chemistry* 72 (2007) 6056-6059.
- [36] P. Macíková, J. Skopalová, P. Cankař, B. Papoušková, R. Straková, D. Jirovský, V. Maier, Electrochemical Oxidation of Tolterodine, *Electroanalysis* 25(1) (2013) 205.
- [37] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/tolterodine#section=Top>, staženo 26. listopadu 2018.
- [38] [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tolterodine\\_tartrate#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tolterodine_tartrate#section=Top), staženo 26. listopadu 2018.
- [39] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01036>, staženo 17. února 2019.
- [40] P. Macíková, Studium a analytické využití elektrochemických transformací biologicky aktivních látek, disertační práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2013.
- [41] K. Young-Hoon, B. Ji-Yeong, K. Se-Hyung, L. Choong-Min, J. Eui Hyun, C. Won Ki, J. Choon-Gon, L. Seok-Yong, L. Yun Jeong, Simultaneous determination of tolterodine and its two metabolites, 5-hydroxymethyltolterodine and *N*-dealkyltolterodine in human plasma using LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study, *Archives of Pharmacal Research* 40 (2017) 1287-1295.
- [42] J. Macek, P. Ptáček, J. Klíma, Determination of tolterodine and its 5-hydroxymethyl metabolite in human plasma by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spektrometry, *Journal of Chromatography B* 877 (2009) 968-974.
- [43] B. Zhang, Z. Zhang, Y. Tian, F. Xu, High performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric determination of tolterodine tartrate in human plasma, *Journal of Chromatography B* 824 (2005) 92-98.

- [44] A.R. Fakhari, H. Tabani, H. Behdad, S. Nojavan, M. Taghizadeh, Electrically-enhanced microextraction combined with maltodextrin-modified capillary electrophoresis for quantification of tolterodine enantiomers in biological samples, *Microchemical Journal* 106 (2013) 186-193.
- [45] M.M. Sakr, R.M.El Nashar, Potentiometric determination of tolterodine in batch and flow injection conditions, *Talanta* 96 (2012) 153-160.
- [46] Ş.E. Tekkeli, Spectrofluorimetric Method for the Determination of Tolterodine In Human Plasma and Pharmaceutical Preparations by Derivatization with Dansyl Chloride, *Bezmialem Science* 5 (2017) 50-55.
- [47] X. Gaméa, B. Benoit Peyronnetb, J.N. Cornuc, Fesoterodine: Pharmacological properties and clinical implications, *European Journal of Pharmacology* 833 (2018) 155–157.
- [48] D. Yilmaz-Oral, N. Bayatli, S. Gur, The Beneficial Effect of Fesoterodine, a Competitive Muscarinic Receptor Antagonist on Erectile Dysfunction in Streptozotocin-induced Diabetic Rats, *Elsevier, Urology* 107 (2017) 271.e1-271.e7.
- [49] J.A. Khusid, J.P. Weiss, M.O. Carlsson, E.K. Mangan, Fesoterodine for the Treatment of Nocturnal Urgency in Patients with Overactive Bladder Syndrome: An Analysis of Responders and Nonresponders, *Journal of urology* 198 (2017) 1119-1123.
- [50] R. Zachoval, Fesoterodin – Nové anticholinergikum pro léčbu hyperaktivního močového měchýře, *Urologie pro Praxi* 9 (2008) 316–322.
- [51] C.E. DuBeau, S.R. Kraus, T.L. Griebeling, D.K. Newman, J.F. Wyman, T.M. Johnson, J.G. Ouslander, F. Sun, J. Gong, T. Bavendam, Effect of Fesoterodine in Vulnerable Elderly Subjects with Urgency Incontinence: A Double-Blind, Placebo Controlled Trial, *The journal of urology* 191 (2014) 395-404.
- [52] [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fesoterodine\\_fumarate#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fesoterodine_fumarate#section=Top), staženo 20. prosince 2018.
- [53] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fesoterodine#section=Top>, staženo 20. prosince 2018.
- [54] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06702>, staženo 17. února 2019.
- [55] P. Kučerová, J. Skopalová, L. Kučera, J. Hrbáč, K. Lemr, Electrochemical oxidation of fesoterodine and identification of its oxidation products using liquid chromatography and mass spektrometry, *Electrochimica Acta* 159 (2015) 131-139.
- [56] J.M. Parekh, M. Sanyal, M. Yadav, P.S. Shrivastav, Investigation of *ex vivo* stability of fesoterodine in human plasma and its simultaneous determination together with its active metabolite 5-HMT by LC–ESI-MS/MS: Application to a bioequivalence study, *Journal of Chromatography B* 913-914 (2013) 1-11.
- [57] M.S. Sangoi, V. Todeschini, M. Steppe, Determination of Fesoterodine in a Pharmaceutical Preparation by a Stability-Indicating Capillary Zone Electrophoresis Method, *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL* 96 (2013) 1308-1314.

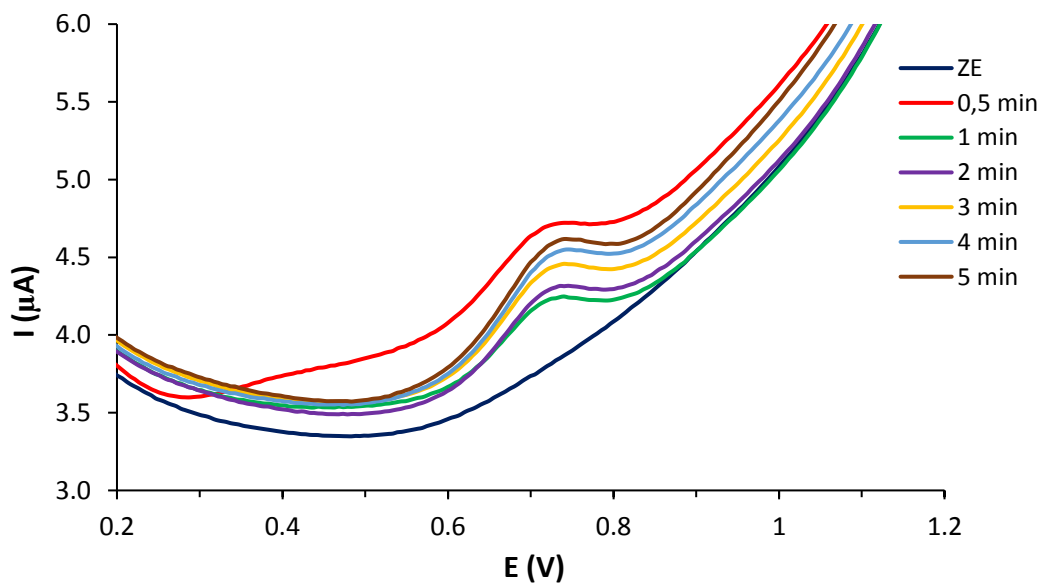
- [58] M.S. Sangoi, V. Todeschini, M. Steppe, Second-Order Derivative UV Spectrophotometric Method for the Determination of Fesoterodine and Comparison with LC, CE and LC-MS/MS in Commercial Extended-Release Tablets, *Acta Chimica Slovenica* 59 (2012) 136-143.
- [59] J. Barek, F. Opekar, K. Štulík, *Elektroanalytická chemie*, Karolinum, Praha 2005, str. 73-120.
- [60] M. Sýs, R. Metelka, M. Stočes, K. Vytřas, Electrochemical properties of  $\alpha$ -tocopherol in aqueous electrolytes after its previous extraction into the glassy carbon paste from aqueous-acetonic mixture, *Monatsh Chem* 147 (2016) 31–38.
- [61] M. Sýs, B. Švecová, I. Švancara, R. Metelka, Determination of vitamin E in margarines and edible oils using square wave anodic stripping voltammetry with a glassy carbon paste electrode, *Food Chemistry* 229 (2017) 621-627.
- [62] M. Sýs, A.S. Farag, I. Švancara, Extractive stripping voltammetry at carbon paste electrodes for determination of biologically active organic compounds, *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* 150 (2019) 373-386.
- [63] N.A. El-Maali, R.M. Hassan, Electrooxidation and determination of the anti-inflammatory drugs Piroxicam and Tenoxicam at the carbon paste electrode, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 24 (1990) 155-163.
- [64] M. Khodari, J.M. Kauffmann, G.J. Patriarche, M.A. Ghandour, Preconcentration and Determination of Promethazine at Lipid-Modified Carbon Paste Electrodes, *Electroanalysis* 1 (1989) 501-505.
- [65] M. Khodari, Voltammetric Determination of the Antidepressant Trimipramine at a Lipid-Modified Carbon Paste Electrode, *Electroanalysis* 5 (1993) 521-523.
- [66] G.A. Mabbott, An introduction to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education* 60 (1983) 697.
- [67] A.H. Suroviec, Introduction to Electrochemistry, *Journal of Laboratory Chemical Education* 1 (2013) 45-48.
- [68] J. Markvart, Voltametrické stanovení diafenthiuronu pomocí uhlíkové pastové elektrody, bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2013.
- [69] P. Vrba, Elektrochemické studium cyklického hydrazidu kyseliny ftalové, bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2010.
- [70] J. Wang, *Analytical electrochemistry*, 3rd ed., Wiley-VCH, Hoboken, New Jersey 2006, str. 80-82.
- [71] P. Córdoba-Torre, A general theory for the impedance response of dielectric films with a distribution of relaxation times, *Electrochimica Acta* 282 (2018) 892-904.
- [72] M. Tatarkovič, G. Broncová, M. Kronďák, Elektroimpedanční spektroskopie a její využití v chemické analýze, *Chemické listy* 106 (2012) 1067-1074.

- [73] E. Vrbová, Elektrochemická impedanční spektroskopie jako charakterizační metoda modifikovaných nanostrukturovaných elektrod, diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Brno 2015.
- [74] R. Jerga, V. Müllerová, J. Štěpánková, P. Barták, H. Tomková, J. Rozsypal, J. Skopalová, Phospholipid-modified carbon fiber brush electrode for the detection of dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* 150 (2019) 395-400.
- [75] B. Picková, Elektrochemická příprava polymerních materiálů, bakalářská práce, Západočeská univerzita v Plzni, Plzeň 2017.
- [76] F. El Hajjajia, M.E. Belghitib, M. Drissic, M. Fahimc, R. Salima, B. Hammoutib, M. Taleba, A. Nahlée, Electrochemical, Quantum Calculations and Monte Carlo Simulation Studies of N1, N2-Bis(1-Phenylethylidene) Ethane-1,2-Diamine as a Corrosion Inhibitor for Carbon Steel in a 1.0 M Hydrochloric Acid Solution, *Portugaliae Electrochimica Acta* 37 (2019) 23-42.
- [77] H. Švecová, J. Součková, M. Pyszková, J. Svítková, J. Labuda, J. Skopalová, P. Barták, Phospholipids improve selectivity and sensitivity of carbon electrodes: Determination of pesticide Paraquat, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116 (2014) 1247-125.

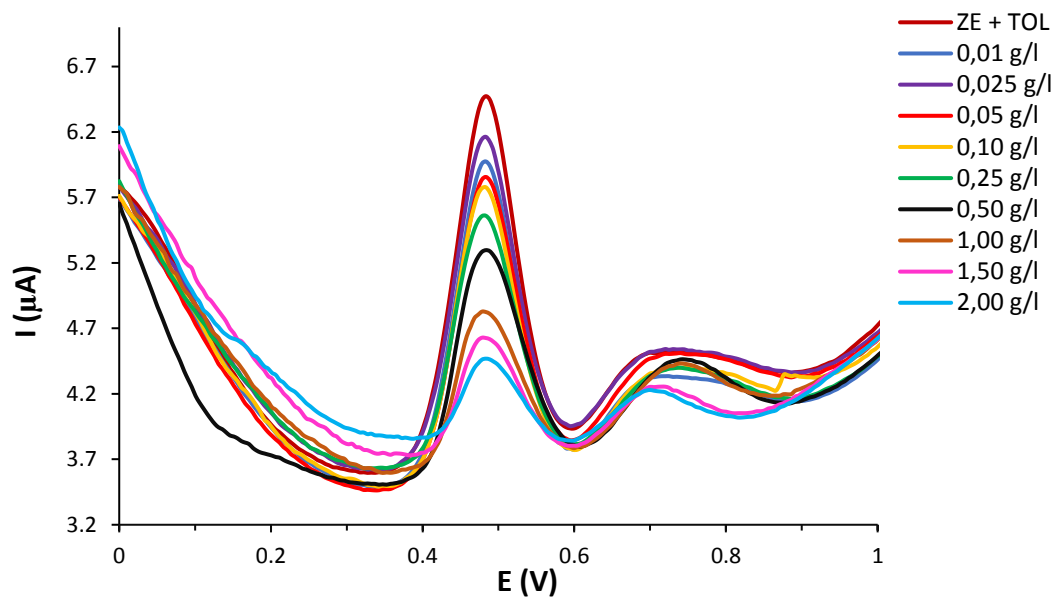
## Přílohy



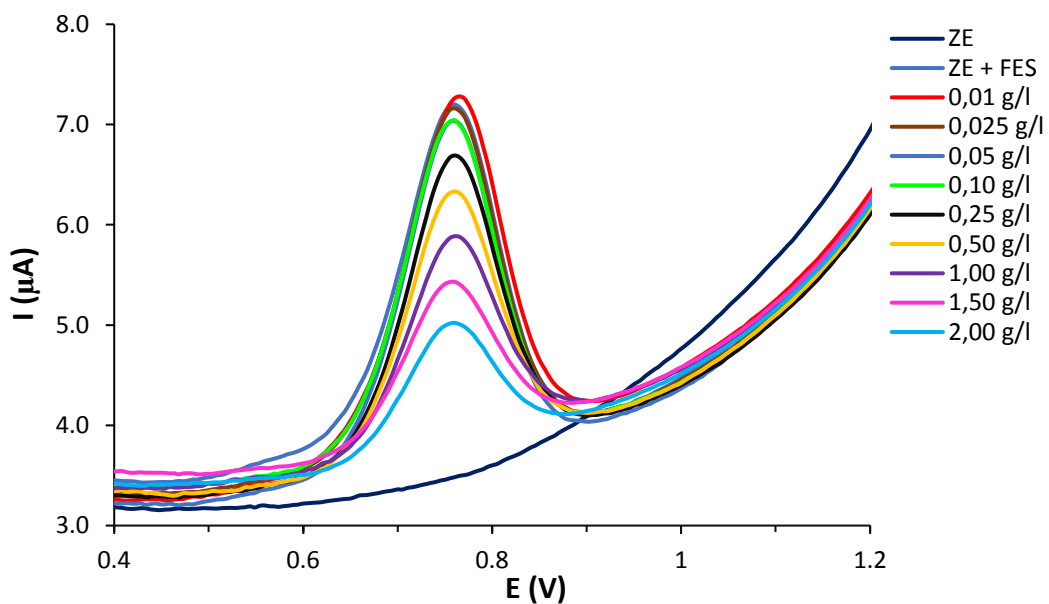
Příloha 1 - Voltamogramy adsorpce TOL na nepokryté elektrodě v závislosti na čase. Měřeno metodou DPV.



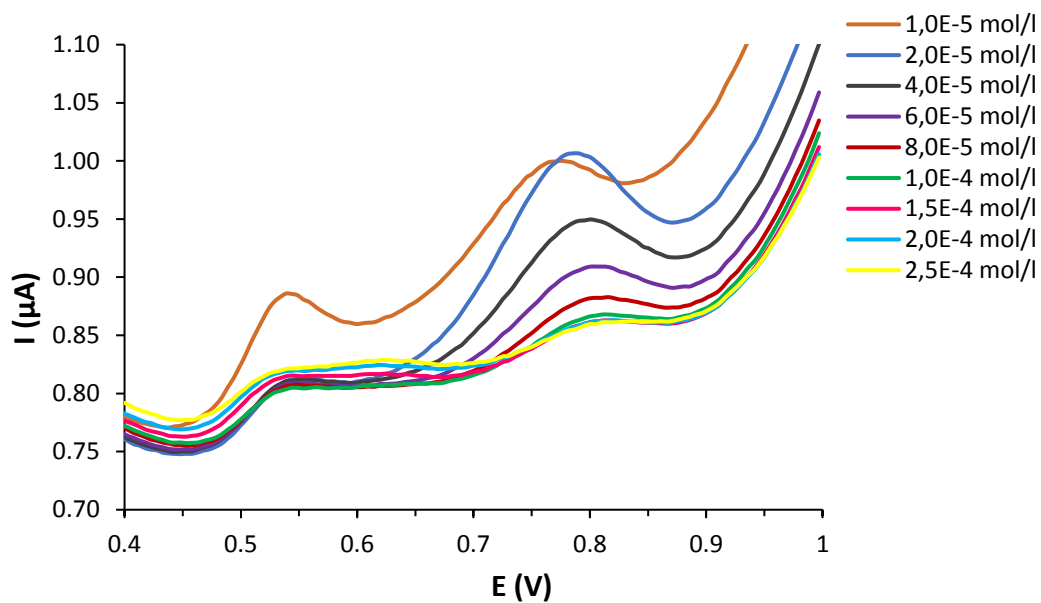
Příloha 2 – Voltamogramy adsorpce FES na pokryté elektrodě v závislosti na čase. Měřeno metodou DPV.



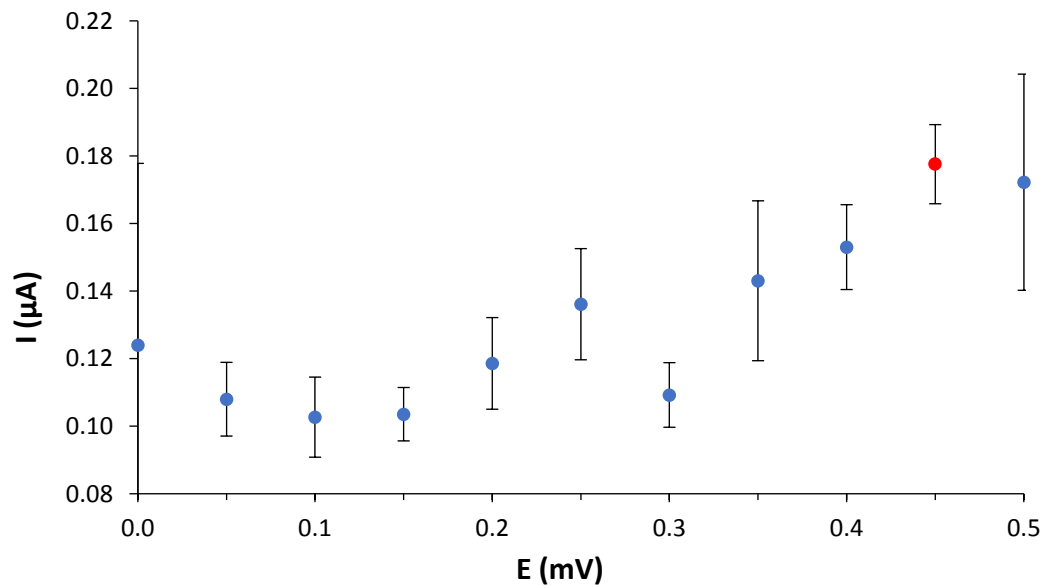
Příloha 3 - Voltamogramy interakce asolectinu a roztoku TOL o koncentraci 2 mmol/l.



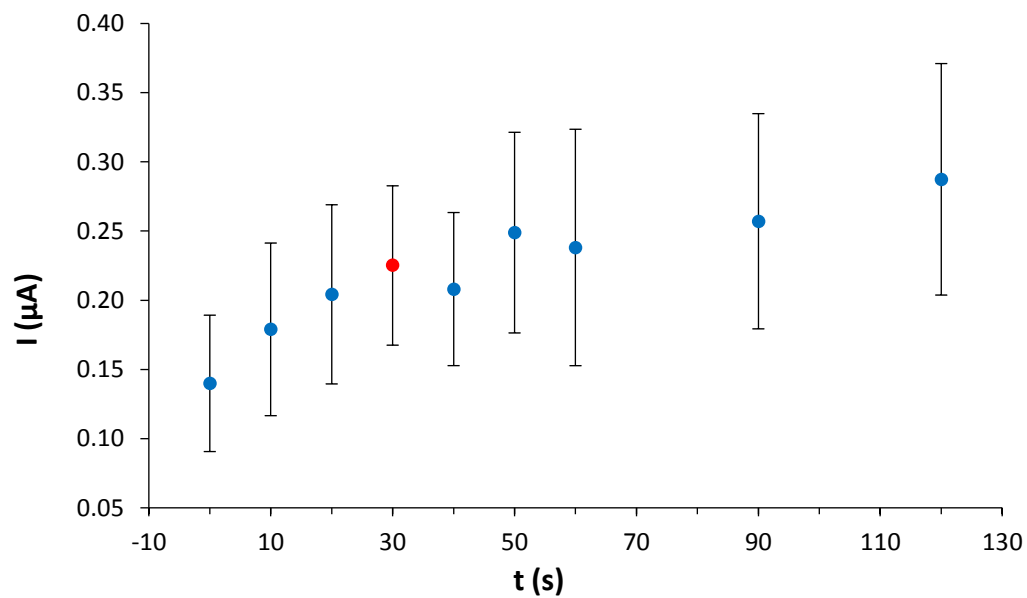
Příloha 4 - Voltamogramy interakce asolectinu a roztoku FES o koncentraci 2 mmol/l.



*Příloha 5 - Voltamogramy kalibrační závislosti TOL s využitím pokryté elektrody pro koncentrace  $1 \cdot 10^{-5}$  až  $2,5 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Měřeno metodou DPV.*



*Příloha 6 - Zjištění nejlepší hodnoty potenciálu pro nižší koncentrace kalibrační závislosti FES s využitím nepokryté elektrody.*



*Příloha 7 - Zjištění nejlepší doby akumulace pro nižší koncentrace kalibrační závislosti FES s využitím nepokryté elektrody.*