

UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra fyzikální chemie

**Význam *in situ* UV-Vis a IČ spektroeletrochemie při
určení redoxního mechanismu bioaktivních látek**

Habilitační práce

Praha, 2022

RNDr. Romana Sokolová, PhD.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou habilitační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu; také s odkazem na literaturu citovanou v příložených publikacích.

V Praze, 28. listopadu 2022

RNDr. Romana Sokolová, PhD.

Předkládaná habilitační práce vychází z výzkumu, který byl prováděn a publikován v letech 2011–2022. Jde o soubor mých publikovaných studií prezentujících výsledky řešení reakčních mechanismů významných bioaktivních látek, opatřený shrnujícím komentářem.

Ráda bych poděkovala všem svým spolupracovníkům a spoluautorům publikovaných odborných článků. Poděkování patří také studentům, ať už z Univerzity Karlovy, VŠCHT nebo zahraničních univerzit, které jsem vedla na našem pracovišti, a kolegům z Oddělení elektrochemie v nanoměřítku Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR za vytvoření přátelské a inspirativní atmosféry v naší laboratoři.

Největší a hluboké poděkování bych ráda vyjádřila Doc. Lubomírovi Pospíšilovi, CSc. za předání mnohých zkušeností z oboru elektrochemie a cenné rady při řešení reakčních mechanismů organických látek.

Děkuji také svým spolupracovníkům z Univerzity Palackého v Olomouci, Univerzity Pardubice a svým dlouhodobým zahraničním partnerům především Dr. Ilarii Degano z University of Pisa v Itálii a Dr. hab. Eng. Jackovi Nyczovi z University of Silesia in Katowice v Polsku za podporu a spolupráci. Poděkování patří také Grantové agentuře ČR a MŠMT za podporu vědeckého výzkumu na našem pracovišti.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům a dcerám za podporu a lásku.

RNDr. Romana Sokolová, PhD.

ABSTRAKT

Tato habilitační práce se zabývá oxidačně-redukčními mechanismy bioaktivních látek při různých experimentálních podmínkách. Jelikož přenos elektronu je zásadní v mnohých biologických dějích, porozumění vztahu mezi chemickou strukturou bioaktivní látky a elektrochemickými vlastnostmi může poskytnout informaci o antioxidačních a farmaceutických účincích. Procesy spojené s přenosem elektronu jsou s výhodou studovány pomocí elektrochemických a spektroeletrochemických metod. Kapitola 2 objasňuje význam elektrochemických metod, důležité historické aspekty, popisuje volbu elektrochemických technik vedoucích k objasnění oxidačně-redukčních mechanismů organických sloučenin. Je ukázán vliv spřažených chemických reakcí na tvar naměřených signálů a na kritéria určení reakčních schémat. Kapitola se také zabývá významem a využitím *in situ* UV-Vis a IČ spektroeletrochemie pro určení vznikajících meziproductů za zvolených podmínek složení roztoku a volby potenciálu. Kapitola 3 ukazuje aplikaci popsaných metod při řešení reakčních mechanismů významných bioaktivních látek. Předkládaná habilitační práce zahrnuje soubor 18 studií publikovaných v letech 2011–2022, opatřených shrnujícím komentářem. Závěr shrnuje význam a rozvoj elektrochemických metod, příspěvek autorky k rozvoji problematiky a zhodnocuje perspektivu použití spektroeletrochemických metod v budoucnosti.

ABSTRACT

This Habilitation Thesis deals with oxidation-reduction mechanisms of bioactive compounds in different experimental conditions. Since electron transfer reactions occur in biological processes, understanding the relationship between the chemical structure of a bioactive compound and its electrochemical properties may provide fundamental information on its antioxidant and pharmaceutical efficiency. The processes involving an electron transfer are preferentially studied by means of electrochemical and spectroelectrochemical methods. Chapter 2 is devoted to the significance of electrochemical methods, recalls important historical aspects, covers a selection of electrochemical techniques leading to the determination of redox mechanisms of organic compounds. Moreover, the effect of coupled chemical reactions on the shape of registered electrochemical responses and on the criteria of reaction schemes is presented. The Chapter further stresses the importance and application of *in situ* UV-Vis and IR spectroelectrochemistry in the determination of intermediates formed at the selected conditions in terms of solution composition and potential. Chapter 3 presents applications to complex systems of the methods previously described and is based on the research on the determination of reaction mechanisms of important bioactive compounds.

This Habilitation Thesis includes 18 scientific studies published in the period from 2011 to 2022 accompanied with the summarizing comment. Final conclusions are provided, stressing the personal contribution to the field, including some general comments and perspectives on the future development in spectroelectrochemical methods.

KLÍČOVÁ SLOVA

Přenos elektronu

Oxidační mechanismus

Redukční mechanismus

Bioaktivní látky

UV-Vis spektroeletrochemie

IČ spektroeletrochemie

Flavonoly

KEYWORDS

Electron transfer

Oxidation mechanism

Reduction mechanism

Bioactive compounds

UV-Vis spectroelectrochemistry

IR spectroelectrochemistry

Flavonols

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	Chinoidní derivát (u polyfenolů)
AH ₂	Nedisociovaná molekula, vyznačeny atomy vodíku na dvou OH skupinách
AH ⁻	Anion, vyznačen atom vodíku na jedné OH skupině
A ²⁻	Dianion
CE	Chemická reakce je předřazena elektronovému přenosu
CV	Cyklická voltametrie
DFT	Funkcionál elektronové hustoty (Density Functional Theory)
DISP	Disproporcionace
EC	Chemická reakce následuje po elektronovém přenosu
ECE	Chemická reakce je vřazena mezi dva elektronové přenosy
EPR	Elektronová paramagnetická rezonance
E_p	Potenciál píku
E_r	Reverzibilní elektronový přenos
E_rC	Chemická reakce následuje po reverzibilním elektronovém přenosu
$E_{1/2}$	Půlvlnný potenciál
e^-	Elektron
FTIR	Infračervená chromatografie s Fourierovou transformací
GC elektroda	Elektroda ze skelného uhlíku (Glassy Carbon)
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HOMO	Nejvyšší obsazený molekulový orbital (Highest Occupied Molecular Orbital)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
HPLC-DAD	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem s diodovým polem
HPLC-MS/MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem s tandemovou hmotnostní spektrometrií
H ⁺	Proton
IČ	Infračervená oblast záření
ITO	elektroda z oxidu inditého In ₂ O ₃ a oxidu ciničitého (SnO ₂) (Indium Tin Oxide)
I_p	Výška píku cyklického voltamogramu po odečtení základní linie (proud v A)
K_{a1}	disociační konstanta disociace do 1. stupně
K_{a2}	disociační konstanta disociace do 2. stupně

LUMO	Nejnižší neobsazený molekulový orbital (Lowest Unoccupied Molecular Orbital)
MS	Hmotnostní spektroskopie
m/z	Poměr hmotnosti a náboje
NMR	Nukleární magnetická rezonance
pK	Záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
Py	Pyridin
SEC	Spektroelektrochemie
t_R	Retenční čas (min)
UV	Ultrafialová (oblast záření)
ν	Rychlost polarizace (skenu) ($V \cdot s^{-1}$)
Vis	Viditelná (oblast záření)
λ	Vlnová délka (nm)
2HP- β -CD	2-hydroxypropyl- <i>beta</i> -cyklodextrin

OBSAH

1. ÚVOD.....	11
2. REDOXNÍ MECHANISMUS ORGANICKÝCH LÁTEK.....	12
2.1. Reakční schémata.....	14
2.2. Komplexy s cyklodextriny.....	18
2.3. UV-Vis a IČ spektroeletrochemie.....	19
3. ELEKTROCHEMIE A SPEKTROELEKTROCHEMIE BIOAKTIVNÍCH LÁTEK.....	24
3.1. Mechanismus oxidace bioflavonoidů.....	24
3.1.1 Mechanismus oxidace flavonolů.....	26
3.1.2 Mechanismus oxidace flavonu luteolinu a flavanonu taxifolinu.....	27
3.1.3 Mechanismus oxidace flavonolignanů.....	28
3.2. Elektrochemie hydroxychinolinových derivátů.....	29
3.2.1 Mechanismus oxidace derivátů hydroxychinolinu.....	29
3.2.1 Oxidace a redukce derivátů hydroxychinolinu obsahující azo skupinu.....	30
3.3. Elektrochemie vybraných derivátů 1,10-fenanthrolinu.....	32
3.3.1 Mechanismus redukce derivátů 1,10-fenanthrolinu substituovaných v poloze 4 a 7....	32
3.3.2 Oxidace derivátů 1,10-fenanthrolinu substituovaných v poloze 4 a 7.....	34
3.4. Charakteristika nových umělých enzymů.....	35
4. ZÁVĚR.....	37
5. PŘÍLOHY.....	38
6. LITERATURA.....	192

Seznam příloh:

- P1.** Sokolová R., Degano I., Bulíčková J., Ramešová Š., Hromadová M., Gál M., Fiedler J., Valášek M.: The oxidation mechanism of the antioxidant quercetin in nonaqueous media. *Electrochim. Acta*, **56**, 7421-7427 (2011).
- P2.** Ramešová, Š., Sokolová, R., Degano, I., Žabka, J., Bulíčková, J., Gál, M.: On the stability of the bioactive flavonoids quercetin and luteolin under oxygen-free conditions. *Anal. Bioanal. Chem.* **402**, 975-982 (2012).
- P3.** Sokolová, R., Ramešová, Š., Degano, I., Hromadová, M., Gál, M., Žabka, J.: The oxidation of natural flavonoid quercetin. *Chem. Commun.*, **48**, 3433-3435 (2012).
- P4.** Ramešová, Š., Sokolová, R., Tarábek, J., Degano, I.: The oxidation of luteolin, the natural flavonoid dye. *Electrochim. Acta*, **110**, 646-654 (2013).
- P5.** Ramešová, Š., Degano, I., Sokolová, R.: Two oxidation pathways of bioactive flavonol rhamnazin under ambient conditions. *Electrochim. Acta*, **133**, 359-363 (2014).
- P6.** Ramešová, Š., Sokolová, R., Degano, I.: The study of the oxidation of the natural flavonol fisetin confirmed quercetin oxidation mechanism. *Electrochim. Acta* **182**, 544-549 (2015).

- P7.** Ramešová, Š., Degano, I., Sokolová, R.: The oxidative decomposition of natural bioactive compound rhamnetin. *J. Electroanal. Chem.* **788**, 125-130 (2017).
- P8.** Kocábová, J., Fiedler, J., Degano, I., Sokolová, R.: Oxidation mechanism of flavanone taxifolin. Electrochemical and spectroelectrochemical investigation. *Electrochim. Acta* **187**, 358-363 (2016).
- P9.** Sokolová, R., Tarábek, J., Papoušková, B., Kocábová, J., Fiedler, J., Vacek, J., Marhol, P., Vavříková, E., Křen, V.: Oxidation of the flavonolignan silybin. *In situ* EPR evidence of the spin-trapped silybin radical, *Electrochim. Acta* **205**, 118-123 (2016).
- P10.** Sokolová, R., Kocábová, J., Marhol, P., Fiedler, J., Biedermann, D., Vacek, J., Křen, V.: Oxidation of natural bioactive flavonolignan 2,3-dehydrosilybin. An electrochemical and spectral study. *J. Phys. Chem. B*, **121**, 6841-6846 (2017).
- P11.** Diamantis, D. A., Ramesova, S., Chatzigiannis, C. M., Degano, I., Gerogianni, P. S., Karadima, C., Perikleous, S., Rekkas, D., Gerothanassis, I. P., Galaris, D., Mavromoustakos, T., Valsami, G., Sokolova, R., Tzakos, A. G.: Exploring the oxidation and iron binding profile of a cyclodextrin encapsulated quercetin complex unveiled a controlled complex dissociation through a chemical stimulus. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subjects (BBA –General Subjects)* **1862**, 1913-1924 (2018).
- P12.** Sokolová, R., Nycz, J. E., Ramešová, Š., Fiedler, J., Degano, I., Szala, M., Kolivoška, V., Gál, M.: Electrochemistry and spectroelectrochemistry of bioactive hydroxyquinolines: a mechanistic study. *J. Phys. Chem. B* **119**, 6074-6080 (2015).
- P13.** Sokolová, R., Ramešová, Š., Degano, I., Hromadová, M., Szala, M., Wantulok, J., Nycz, J. E., Valášek, M.: Application of spectroelectrochemistry in elucidation of electrochemical mechanism of azoquinoline dye 2-methyl-5-[(*E*)-phenyldiazenyl]quinolin-8-ol. *Electrochim. Acta* **270**, 509-516 (2018).
- P14.** Wantulok, J., Degano, I., Gal, M., Nycz, J. E., Sokolova, R.: IR spectroelectrochemistry as efficient technique for elucidation of reduction mechanism of chlorine substituted 1,10-phenanthrolines. *J. Electroanal. Chem.* **859**, article n. 113888, 1-10 (2020).
- P15.** Wantulok, J., Sokolova, R., Degano, I., Kolivoska, V., Nycz, J. E.: The effects of 4,7-di(pyrrolidin-1-yl) substituents on the reduction and oxidation mechanisms of 1,10-phenanthrolines: new perspectives in tailoring of phenantroline derivatives. *Electrochim. Acta* **370**, article n. 137674 (2021).
- P16.** Book Chapter: https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-0716-0920-0_20
Sokolová R., Degano I. (2021) Electrochemistry investigation of drugs encapsulated in cyclodextrins. In: Mavromoustakos T., Tzakos A.G., Durdagi S. (eds.) *Supramolecules in Drug Discovery and Drug Delivery. Methods in Molecular Biology*, vol. 2207, p 285-298, Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0920-0_20
- P17.** Wantulok, J., Sokolová, R., Degano, I., Kolivoška, V., Nycz, J. E., Fiedler, J.: Spectroelectrochemical properties of 1,10-phenanthroline substituted by phenothiazine and carbazole redox-active units. *ChemElectroChem* **8**, 2935-2943 (2021).
- P18.** Sýs, M., Kocábová, J., Klikarová, J., Novák, M., Jirásko, R., Obluková, M., Míkysek, T., Sokolová, R.: Comparison of mononuclear and dinuclear copper (II) biomimetic complexes: spectroelectrochemical mechanistic study of their catalytic pathways. *Dalton Trans.*, **51**, 13703-13715 (2022).

1. ÚVOD

Rešerše dosavadní literatury ukázala, že biologicky aktivní látky, například léčiva, návykové látky a kontaminanty, které mohou být přijaty organismem, a nemají žádnou fyziologickou funkci, podléhají biochemické přeměně. Metabolické přeměny těchto látek, ať už jsou přírodního nebo syntetického charakteru, vedou ke vzniku tzv. metabolitů. Tyto procesy zahrnují přenos elektronu a dochází k oxidaci nebo redukci biologicky aktivních látek. Celý děj zahrnuje tvorbu radikálů, krátce žijících meziproduktů a řadu chemických reakcí. Nicméně jejich vlastní redox vlastnosti nebyly obvykle plně studovány. Znalost elektrochemických vlastností těchto látek a určení jejich oxidačního a redukčního mechanismu může významně přispět k vysvětlení mechanismu jejich účinku a k identifikaci vznikajících metabolitů, které mají často jinou chemickou strukturu než látky původní, a tedy odlišnou bioaktivitu.

Významem elektrochemie, volbou elektrochemických technik a objasněním redoxních mechanismů organických sloučenin za efektivního využití naměřeného cyklovoltametričeského signálu při řešení komplikovaného redoxního mechanismu se zabývá první část předkládané habilitační práce. Další část se věnuje využití a významu *in situ* UV-Vis a IČ spektroeletrochemie při hledání elektroaktivních míst v molekule, vznikajících meziproduktů a reakčních produktů. Habilitační práce je založena na výběru původních prací autorky publikovaných v mezinárodních časopisech, jedné kapitoly v knize (Přílohy **P1–P18**) a dalších článkách autorky citovaných v přehledu literatury.

2. REDOXNÍ MECHANISMUS ORGANICKÝCH LÁTEK

Elektrochemické techniky mají významné uplatnění při objasnění vztahu mezi chemickou strukturou organické látky a její elektrochemickou aktivitou. Redoxní vlastnosti látek vypovídají například o jejich schopnosti působit jako antioxidanty, tj. minimalizovat oxidativní stres a tvorbu nebezpečných volných radikálů. Tuto aktivitu je možné posoudit z oxidačních potenciálů zjištěných za fyziologických podmínek při pH 7.4 [1,2]. Ukázalo se, že zjištěné potenciály pro vybrané polyfenoly korelují s jejich schopností působit jako antioxidanty, účinné antioxidanty jako quercetin a rhamnetin se oxidují v roztoku o pH 7,4 při stejném potenciálu $E_p = 0,2$ V oproti argentschloridové elektrodě, zatímco méně účinný luteolin vykazuje oxidační vlnu při $E_p = 0,3$ V za stejných podmínek (Přílohy **P3**, **P4**, **P7**).

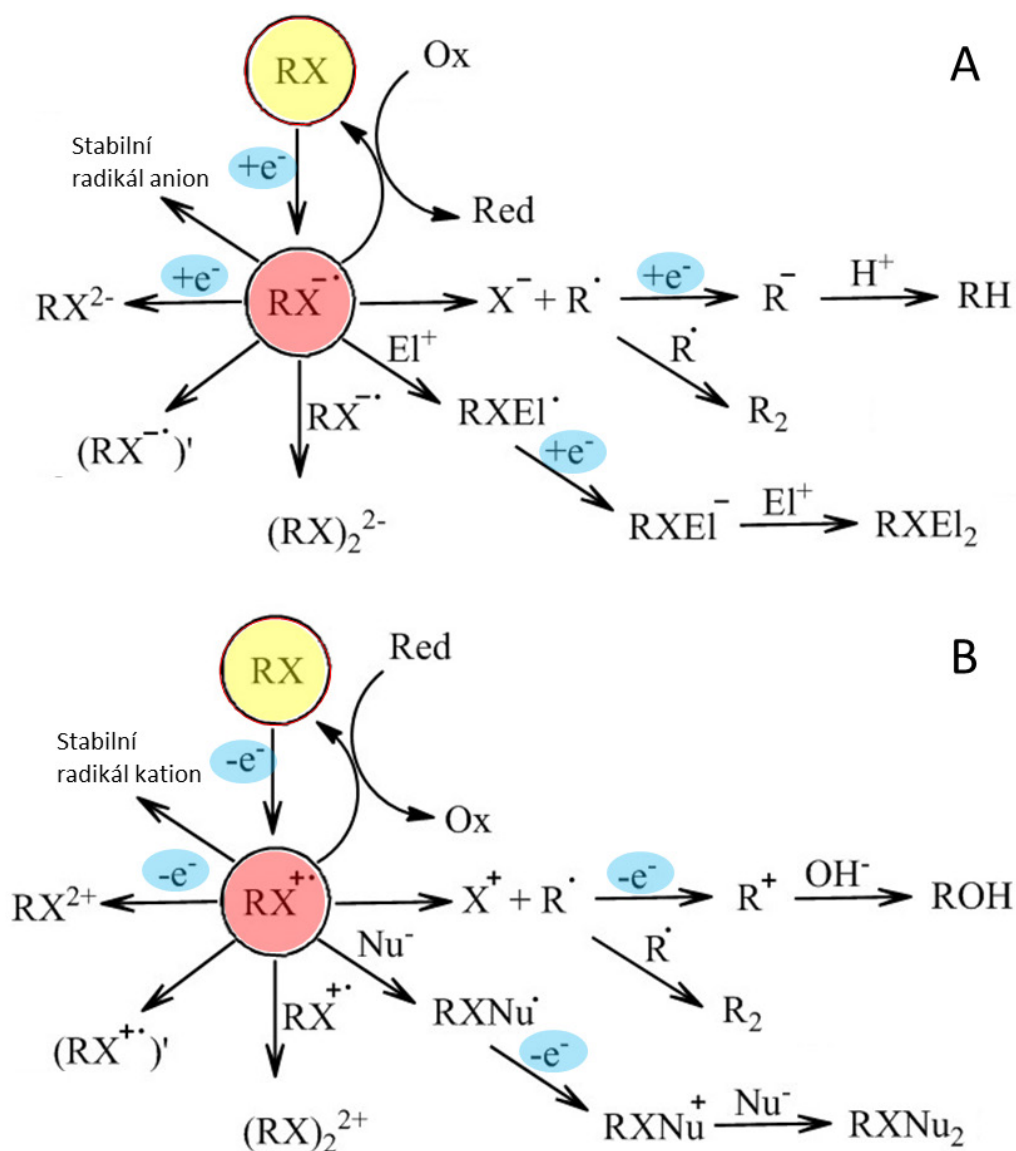
Při studiu mechanismu oxidace a redukce se využívají následující elektrochemické metody: cyklická voltametrie, polarografie, coulometrie [3]. Ze tvaru a vlastností získaného cyklovoltametričeského nebo polarografického signálu ($I - E$ křivka) při volbě vhodných parametrů metody a vhodného složení roztoku lze posoudit reverzibilitu elektrodového děje, odlišit kinetické proudy a tedy určit vliv spřažených chemických reakcí na elektrodový děj (typ reakčního schématu (viz kap. 2.1.)) [4,5]. Coulometrie, technika na základě Faradayových zákonů, slouží k určení počtu elektronů, které se účastní redoxních dějů. Tento údaj je nezbytný pro odvození mechanismu oxidace či redukce. Coulometrii, resp. vyčerpávací oxidativní nebo reduktivní elektrolýzu, lze také využít pro následnou analýzu konečných reakčních produktů pomocí dalších fyzikálních a analytických technik jako jsou spektrofotometrie, nukleární magnetická rezonance (NMR) a hmotnostní spektroskopie (MS), chromatografické metody HPLC-DAD, HPLC-MS/MS, GC-MS.

Neocenitelný význam cyklické voltametrie nebo polarografie pro určení redoxního mechanismu, který zahrnuje přenos elektronu a časově závislé chemické děje, je popsán v kap. 2.1. Ukázalo se, že elektrochemické techniky v *in situ* spojení se spektroskopii dokážou využít výhody obou přístupů. Spektroskopické metody monitorují vlastnosti látek v roztoku přímo u povrchu elektrody a registrovaná spektra poskytují spektrální charakterizaci elektrochemicky generovaných meziproductů, a tedy přinášejí informaci o průběhu časově závislých chemických dějů za kontrolovaných podmínek (zvoleného vloženého potenciálu). Nejčastěji používané spektrální metody při spektroelektrochemii (SEC) jsou absorpční spektroskopie v ultrafialové (UV), viditelné (Vis) a infračervené (IČ) oblasti záření [6- 11], také Ramanova spektroskopie a elektronová paramagnetická rezonance (EPR) [12,13]. Nicméně jsou známé také

spektroelektrochemické techniky využívající nukleární magnetickou rezonanci a luminiscenci v oblasti UV-Vis [9,14 -19]. O principech *in situ* UV-Vis a IČ spektroelektrochemie a významu při určení chemické reverzibility a elektroaktivního místa molekuly pojednává kap. 2.2.

2.1. Reakční schémata

Vzhledem k tomu, že při oxidaci nebo redukcí většiny organických látek dochází k přeměně jejich funkčních skupin, sledujeme děje, které zahrnují přenos elektronu a různé chemické reakce v závislosti na prostředí. Příklady možných redukčních a oxidačních mechanismů organické látky RX zobrazuje obr. 1.



Obr. 1. A) Možné redukční mechanismy pro organickou látku RX. B) Možné oxidační mechanismy pro organickou látku RX (upraveno podle [20]).

Elektrochemie dokáže s výhodou rozlišit mezi různými typy reakčních schémat, které zahrnují heterogenní přenos elektronu (E) a spřažené homogenní chemické reakce (C). Na skutečnost, že chemické reakce ovlivňují tvar a polohu měřeného signálu $I - E$ křivky upozornili již v

padesátých letech minulého století Brdička a Wiesner [4]. Podle vzájemného pořadí přenosu elektronu a chemické reakce lze rozlišit následující reakční schémata:

- a) CE – chemická reakce je předřazená přenosu elektronu (elektrochemicky aktivní forma vzniká chemickou reakcí z elektrochemicky inaktivní formy rovnice (1))



- b) EC – chemická reakce následuje po přenosu elektronu (produkt vznikající přenosem elektronu podléhá chemické reakci rovnice (2))



- c) ECE – chemická reakce je vřazená mezi dva přenosy elektronu (produkt vznikající po EC ději je elektrochemicky aktivní, rovnice (3))



Dalšími typy reakčních schémat se spřaženými chemickými reakcemi jsou mechanismy, které vycházejí z EC mechanismu, například katalytická obnova původní látky následnou chemickou reakcí nebo tzv. čtvercové schéma, které spojuje dva EC mechanismy [5,33]. Naposled jmenované čtvercové schéma může být základem složitějšího mechanismu, který ukazuje vztah víceelektronové redukce nebo oxidace a protonizačních reakcí. Toto schéma poprvé publikoval Jacq [21] pro redukční děje, může se vyskytovat ve tvaru plotu, žebříku apod. Předkládaná práce ukazuje podobné schéma pro oxidaci různých disociovaných forem luteolinu (kap. 3.1, Příloha P4).

Teorie vlivu spřažených chemických reakcí na tvar polarogramu, jeho výšku a polohu na potenciálové ose a určení rychlostních konstant spřažených chemických reakcí pomocí hodnot půlvlnného potenciálu $E_{1/2}$ je v literatuře podrobně rozpracována pro polarografickou metodu v dílech Heyrovského, Kouteckého, Koryty, Matsudy a dalších [4, 22-28]. Tyto zákonitosti je možné využít také pro oxidační elektrodové děje, kdy je oxidační vlna měřena na pevných elektrodách pomocí cyklické voltametrie a je provedena semi-integrace získaného signálu [29-32]. Cyklická voltametrie je excelentní metodou široce využívanou pro odvození reakčního schématu [3,5,33-36]. Vlastnosti naměřených cyklických voltamogramů, které jsou důležité pro určení typu redoxního mechanismu v literatuře zahrnují: závislost výšky voltametrického píku

(po odečtení základní linie, nabíjecího proudu) I_p na rychlosti polarizace (skenu) v včetně vyhodnocení průběhu závislosti I_p / \sqrt{v} , závislost potenciálu píku E_p na rychlosti skenu, vlastnosti poměru výšek anodického a katodického voltametrického píku I_p^a / I_p^c v závislosti na rychlosti skenu [5]. Z hodnot (posunu) potenciálů píku nebo půlvlnových potenciálů je možné určit počet účastnících se ligandů v případě rozličných redox reakcí komplexů, jak popsal Koryta [24] a je možné určit konstantu stability chelátu [37]. Kritéria pro charakterizaci mechanismu redukce nebo oxidace a určení rychlostních konstant spřažených homogenních reakcí pomocí cyklické voltametrie jsou výstižně popsána v pracích J.-M. Savéanta [36]. Tato kritéria jsou platná pro děje, které jsou řízeny difúzí látky k povrchu elektrody, nelze je uplatnit pro elektrodové děje spojené s adsorpcí látek na elektrodě. Teorii použití polarografie a cyklické voltametrie při současné adsorpci reaktantů rozpracoval Laviron [38,39], nicméně pro určení reakčního schématu je nejlépe zvolit takové reakční podmínky, kdy k adsorpci látky na povrch elektrody nedochází. Určení správného redoxního mechanismu je výsledkem kombinací výše uvedených vlastností elektrochemického chování za vhodně zvolených reakčních podmínek a diagnostických kritérií pro jednotlivá reakční schémata [5,36].

Většina oxidačních mechanismů diskutovaných v této práci byla v souladu s reakčním schématem ECE, kdy produkt po prvním přenosu elektronu (E) podléhal chemické reakci disociací H^+ (C) za vzniku produktu, který se snáze oxiduje než původní molekula. Navíc zde v některých případech docházelo k následné nukleofilní adici vody a konečné reakční schéma bylo ECEC. Uvedené chování vykazovaly různě substituované flavonoly ve vodném prostředí, například quercetin (Přílohy **P3**, **P11**), rhamnazin (Příloha **P5**), fisetin (Příloha **P6**), rhamnetin (Příloha **P7**), flavonolignan 2,3-dehydrosilybin (Příloha **P10**), 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavon luteolin (Příloha **P4**), 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavanon taxifolin (Příloha **P8**), hydroxylované sloučeniny chinolinu (Příloha **P12**), 2-methyl-5-[(*E*)-fenyldiazenyl]-chinolin-8-ol (Příloha **P13**), 4,7-di(pyrrolidin-1-yl)-1,10-fenanthrolinu (Příloha **P15**) a 4,7-di(fenothiazin)-1,10-fenanthrolinu (Příloha **P17**). Reakční schéma ECE nebo mechanismus ECE – DISP (disproporcionace) lze určit z výsledků $\delta E_p / \delta \log v = 29,6$ mV a $\delta E_p / \delta \log c = 29,6$ mV získaných z tvaru cyklických voltamogramů [36].

Potenciál oxidace, ale také mechanismus oxidace studovaných flavonolů závisí na pH roztoku, a tedy na přítomnosti disociovaných forem látky při určitém pH. Například flavonoly quercetin, fisetin a rhamnetin podléhají jednoelektronové oxidaci disociované formy dianionu v alkalickém prostředí (kap. 3.1.1, Přílohy **P3**, **P6** a **P7**). Na příkladu flavonolu quercetinu je

vidět také významný vliv typu rozpouštědla na reakční schéma oxidace (Příloha **P1**). Bylo zjištěno, že quercetin poskytuje v prostředí acetonitrilu oxidační vlnu, která má výšku píku odpovídající dvouelektronovému ději, nicméně vykazuje charakteristické vlastnosti vlny jednoelektronové. Logaritmická analýza semiintegrovaných proudů poskytla výsledek 68 mV na dekádu ukazující na E_rC děj (směrnice udávaná typicky pro jednoelektronový reverzibilní děj E_r je 58 mV na dekádu [29]). Tento jev je zvláštním případem pro dva nezávislé jednoelektronové oxidační děje (zde zároveň spřažené s přenosem protonu), poskytující vlny jejichž potenciál se liší o 35,6 mV [40]. Tento mechanismus zjištěný v prostředí acetonitrilu byl významným přínosem pro objasnění mechanismu oxidace quercetinu (Příloha **P1**). Vznikající chinoidní derivát podléhá další reakci popsané v kap. 2.3 a shrnuté v kap. 3.1.1. Objasnění složitého reakčního schématu dokládá význam *in situ* UV-Vis spektroelektrochemie při řešení redoxního mechanismu látek.

Redukční mechanismus substituovaných derivátů 1,10-fenanthrolinu, které jsou uvedeny v této práci, patří mezi ECE reakční schémata, kdy ze vznikajícího radikál anionu po prvním elektronovém přenosu dochází během spřažené chemické reakce k odštěpení funkční skupiny vázané na aromatickém kruhu (kap. 3.3.1, Přílohy **P14**, **P15**, **P17**). Redukce derivátů hydroxychinolinu obsahující azo skupinu zahrnovala účast vodíkových kationů při redukci, reakční schéma ECE zahrnuje tvorbu radikál anionu v prvním elektrochemickém kroku (E), přijetí H⁺ (C) a redukci vzniklého radikálu na anion (E). Tento děj je dokončen přijetím H⁺ z roztoku (C) a vede k výslednému reakčnímu schématu ECEC, kdy za určitých podmínek je druhý chemický krok rychlost řídicím dějem celého redukčního procesu (Příloha **P13**).

Z výše uvedeného je patrné, že přítomnost iontů H⁺ hraje důležitou úlohu při řešení mechanismu oxidace a redukce. V mnohých případech nelze jednoduchým způsobem aplikovat známé principy a diagnostická kritéria zmíněné výše v textu. Tvar a poloha získaného signálu na potenciálové ose významně závisí na složení roztoku a vhodným cíleným výběrem podmínek lze zjistit, zda výška vlny I_p odpovídá difúzí řízeným podmínkám. Naměřený signál může být pod vlivem chemické reakce, která je rychlost řídicím dějem, a naměřené proudy jsou tzv. proudy kinetické díky nedostatku H⁺ kationů, proton donoru (pro redukci, Příloha **P13**) nebo nedostatku proton akceptoru (pro oxidace, Příloha **P12**). Tyto jevy mohou mít významnou úlohu v bioaktivitě látek, jelikož heterocyklické sloučeniny dusíku se v organismu vyskytují v podobě purinových a pyrimidinových bazí a tyto mohou sloužit jako proton akceptory při probíhajících reakcích.

2.2. Komplexy s cyklodextriny

V případě bioaktivních látek, například léčiv, hraje významnou úlohu jejich dostupnost v organismu, která je často dána sníženou rozpustností těchto látek ve vodném prostředí. Biodostupnost je důležitou farmakokinetickou vlastností léčiv [41,42], rychlost a rozsah dostupnosti je ovlivněna mimo jiné fyzikálně-chemickými vlastnostmi látky ovlivňující rozpustnost. Rozpustnost může být ovlivněna vhodnou volbou funkčních skupin již při syntéze těchto látek nebo přípravou jejich komplexů s vhodnými hostiteli jako jsou cyklodextriny, kalixareny, gely. Stabilita komplexů (vliv na rozpad lékové formy), ale také bioaktivita komplexu samotného hraje významnou úlohu. Cyklodextriny jsou široce používanými přenašeči účinných látek díky své hydrofobní kavitě [42-46, Příloha P11]. Nicméně tyto látky mohou velmi účinně měnit elektrochemické chování látek, které jsou komplexovány v kavitě. Toto může nastat, pokud je elektrochemicky aktivní místo molekuly chráněno uvnitř kavity cyklodextrinu a dochází tedy k oxidaci nebo redukci jiným mechanismem [47,48]. V případě látky, která je elektrochemicky aktivní pouze v kyselém prostředí, může dojít k její redukci také v neutrálním a alkalickém prostředí, je-li protonizace zajištěna molekulou cyklodextrinu. Tato okolnost nasvědčuje tomu, že kavita cyklodextrinu je schopná protonizovat látku v kavitě pomocí vodíkových vazeb a vytvořený komplex s cyklodextrinem podléhá redukci [49]. Příloha P11 ukazuje na důležitý výsledek ve vztahu k aktivitě komplexu, kdy bylo zjištěno, že inkluzní komplex flavonoidu quercetinu a 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinu (2HP- β -CD) se oxiduje stejným mechanismem jako volný quercetin. Navíc, nestabilní produkt oxidace byl v kavitě stabilizován (Přílohy P11 a P16). Zjištěný mechanismus oxidace pro jednotlivé disociované formy prokazuje, že elektroaktivní skupiny quercetinu jsou přístupné v kavitě nebo mimo kavitu hostitele. Potenciál první oxidační vlny komplexu byl naměřen při stejných potenciálech jako pro volný quercetin v roztocích do pH 8,8 (komplex se nad pH 8,8 rozkládal). V porovnání s volným quercetinem byly výšky píků v cyklických voltamogramech úměrně nižší díky větší hodnotě difúzního koeficientu. Výše popsaný mechanismus je příkladem děje, kdy se oxiduje celý komplex a nedochází k jeho rozpadu před přenosem elektronu.

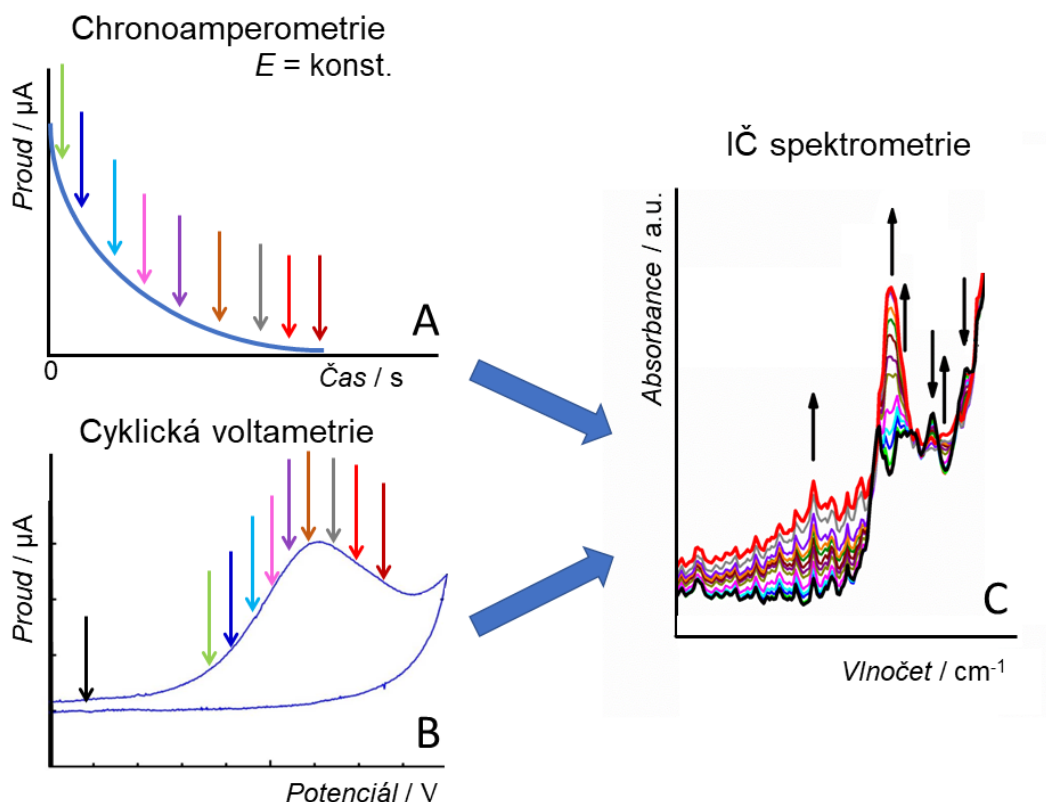
Jak je uvedeno v příloze P16, která se věnuje podrobně elektrochemii léčiv komplexovaných v cyklodextrinu, při oxidaci komplexu může nastat další situace, kdy dochází k přenosu elektronu až po disociaci komplexu. V tomto případě se uplatňuje CE mechanismus a je možné určit konstantu stability komplexu podle rovnice (1) uvedené v příloze P16 a referencích uvnitř citovaných. Komplex je oxidován při vyšším potenciálu než volná molekula. Opačným případem je děj, kdy dochází ke komplexaci produktu elektronového přenosu v kavitě

cyklodextrinu, a hodnota půlvlnného potenciálu redukce látky v přítomnosti cyklodextrinu byla naměřena nižší než pro látku samotnou [30]. Při práci s cyklodextriny je potřeba mít na paměti, že tyto látky vykazují adsorpční vlastnosti a v cyklickém voltamogramu je potřeba rozlišit případné adsorpční předvlny nebo zavlňny [4]. Je známo, že adsorpční zavlňna se objevuje u látek, které se za daných podmínek na elektrodě adsorbují, naopak adsorpční předvlňna se objevuje při adsorpci oxidované formy [3,4].

V případě komplexů s cyklodextrinem byly adsorpční předvlňny a zavlňny autorkou této habilitační práce a spoluautory identifikovány ve voltamogramech v publikaci Heřmánková E. a kol. [50 (práce nebyla zařazena do výběru publikací pro tuto habilitační práci)] v roztocích obsahujících různý podíl ethanolu.

2.3. UV-Vis a IČ spektroeletrochemie

Metoda *in situ* UV-Vis a IČ spektroeletrochemie významně přispívá k určení redoxního mechanismu studovaných látek. Základem této techniky je záznam absorpčního spektra při potenciálu, kdy není látka elektrochemicky aktivní a poté sledování absorpčního spektra v průběhu aplikace potenciálu buď A) v režimu chronoamperometrie za současného záznamu $I-t$ křivky nebo B) v režimu proměnného vkládaného potenciálu, typicky cyklické voltametrie. Princip měření je znázorněn na Obr. 2. V případě kombinace měření absorpčních spekter s technikou chronoamperometrie, první absorpční spektrum je měřeno před potenciálovým skokem (černá křivka, Obr. 2C). Vzhledem k tomu, že konstrukce tenkovrstvé spektroeletrochemické cely [51], která byla použita v publikacích zmíněných v této práci, vykazuje vysoký poměr (nabitý povrch) / (objem roztoku) a umožňuje měření roztoku v difúzní vrstvě elektrody, dochází v režimu A při aplikaci potenciálu k rychlé elektrolýze látky v celém elektrodovém prostoru. Tímto prostorem o tloušce 0,19 mm (v případě užívané cely) prochází paprsek spektrometru. Měření spektroeletrochemie má určitá omezení v závislosti na použité celi, na materiálu pracovní elektrody, vyžaduje know-how a zručnost operátora, například v nastavení rychlosti polarizace nebo čištění pracovní elektrody apod. Často využívané pracovní elektrody jsou transparentní elektrody tvořené oxidy india a cínu (ITO) nebo polopropustné kovové mřížky [].

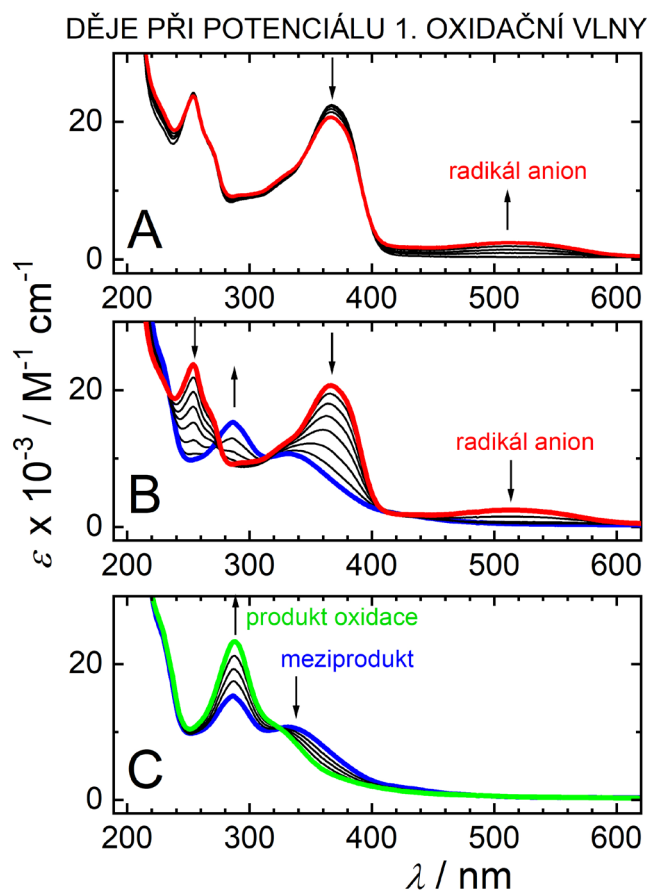


Obr. 2. Schematické znázornění principu měření *in situ* IČ spektroelektrochemie v režimu A) chronoamperometrie, B) cyklické voltametrie. Panel C ukazuje absorpční spektra měřená (A) v čase nebo (B) při potenciálu označenými na panelech A a B barevnými šipkami. Panel C je převzat a upraven z Přílohy P10. Šipky v panelu C ukazují růst absorbance nových absorpčních pásů a pokles absorbance pásů původní látky.

Nespornou výhodou *in situ* UV-Vis spektroelektrochemie je odhalení přítomnosti neznámých meziproductů redoxních procesů. Příkladem je oxidace flavonolu quercetinu, kdy v průběhu oxidace při potenciálu první oxidační vlny došlo k několika po sobě následujícím dějům. Změny absorpčních křivek ukazuje obr. 3 (upravený a převzatý z Přílohy P1). Na obr. 3A je vidět prvotní tvorba radikálového anionu (nárůst absorbance při 515 nm). Z dalších změn absorpčních spekter je patrné, že dochází ke vzniku meziproductu (modrá křivka na obr. 3B) a následně produktu (zelená křivka na obr. 3C). Všechny tyto časově závislé procesy je možné rozlišit správným nastavením experimentu, vhodnou volbou rozpouštědla, optimální volbou rychlosti změny polarizace v případě cyklovoltametrického režimu atd. Podrobněji se oxidaci quercetinu věnuje kap. 3.1.

Při měření UV-Vis spektroelektrochemie je důležité sladit experimentální podmínky požadované oběma technikama, spektrofotometrií a elektrochemií. Pro spektrofotometrii je

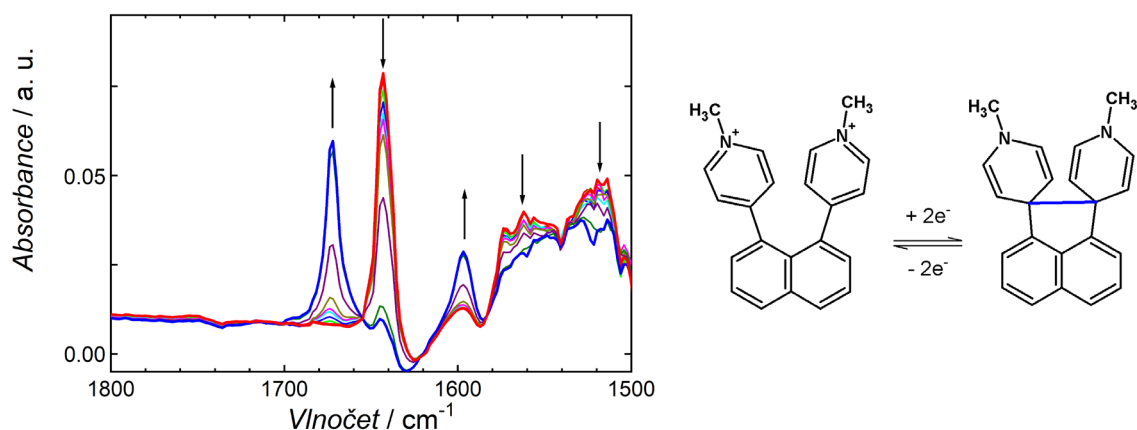
důležité sledovat absorpční křivku v rozmezí absorbancí 0 až 1. Toto vyžaduje sladění krátké dráhy světelného paprsku danou konstrukcí spektroelektrochemické cely s koncentrací roztoku měřené látky. Pro elektrochemická měření je nutné zajistit čistý a aktivní povrch elektrody a přiměřenou proudovou odezvu umožňující rozlišení jednotlivých redoxních kroků.



Obr. 3. In situ spektroelektrochemie 1,3 mM quercetinu v acetonitrilu/ 0,1 M TBAPF₆. Absorpční spektra zaznamenaná v průběhu oxidace quercetinu při potenciálech první oxidační vlny. Pracovní elektroda: platinová mřížka 5x5 mm.

Další použití in situ UV-Vis a IČ spektroelektrochemie vyplývá z možnosti aplikace redukčního (resp. oxidačního) potenciálu v režimu chronoamperometrie a následným skokem na potenciál oxidace (resp. redukce) vzniklého produktu. Tímto postupem je možné prověřit reverzibilitu redoxního děje. V případě elektrochemicky či chemicky reverzibilních dějů je možné po provedení obou potenciálových skoků získat absorpční spektrum původní látky se stejnou intenzitou. Příkladem je reverzibilní redukce 1,8-dipyridyliumnaftalenu v nevodném prostředí acetonitrilu, kdy dochází ke tvorbě kovalentní vazby mezi dvěma pyridiniovými

jednotkami v molekule. Tato intramolekulární vazba je charakterizována novými absorpčními pásy při 1673 a 1597 cm^{-1} (Obr. 4). Při aplikaci potenciálu oxidace tento absorpční pás vymizel a bylo registrováno původní IČ spektrum látky [53]. Tento jev chemické reverzibility byl potvrzen také pomocí UV-Vis spektroeletrochemie [53].



Obr. 4. *In situ* IČ spektroeletrochemie 2,8 mM 4,4'-(naphthalene-1,8-diyl)-bis(1-methylpyridin-1-ium)(PF₆)₂ v acetonitrilu/ 0,1 M TBAPF₆. Absorpční spektrum látky je znázorněno červenou křivkou, modrá křivka znázorňuje absorpční spektrum získané po aplikaci redukčního potenciálu -1.2 V proti Ag/AgCl referentní elektrodě. Obrázek měřený autorkou je upraven podle publikace [53] nezahrnuté do výběru komentovaných prací. Vpravo: chemická reakce vzniku intramolekulární vazby po redukcí látky.

Měření IČ spektroeletrochemie vyžaduje nejen správnou volbu rozpouštědla a základního elektrolytu, ale také vhodně zvolená optická okénka spektroeletrochemické cely. Pro měření v oblasti infračerveného záření mohou být použity různé materiály, nejčastěji používaným je KBr nebo CaF₂. Posledně jmenovaný materiál optického okénka dovoluje záznam absorpčních spekter v rozmezí od UV oblasti až k 1000 cm^{-1} . Při použití deuteriovaných rozpouštědel je možné omezit oblasti silné absorpce rozpouštědla (oblast C–H pásů ad.). Při volbě vhodného rozpouštědla je třeba zohlednit aspekty spektroskopické (nízká absorpce ve sledované spektrální oblasti) i elektrochemické (vodivost, rozpustnost základního elektrolytu). Nejčastěji používaná rozpouštědla jsou dichlormethan, tetrahydrofuran a acetonitril [52]. Důležitým aspektem pro měření IČ spektroeletrochemie bývá požadavek poměrně vysoké koncentrace měřené látky v roztoku (např. 20 mM), která je dostatečná pro získání dostatečného poměru signál/šum při měření absorpčních pásů některých vibrací. Tyto koncentrace převyšují

běžně používané koncentrace při klasických elektrochemických měřeních metodou cyklické voltametrie (typicky < 1 mM). Při použití vysokých koncentrací dochází ovšem k problémům s pasivací elektrody. Metoda IČ spektroelektrochemie v kombinaci s výpočtem infračerveného spektra možných produktů významně přispěla k odhalení oxidačního mechanismu nové návykové látky 3-fluorofenmetrazinu a k návrhu mechanismu transformace této látky patřící mezi nové psychoaktivní látky [54].

3. ELEKTROCHEMIE A SPEKTROELEKTROCHEMIE BIOAKTIVNÍCH LÁTEK

3.1. Mechanismus oxidace bioflavonoidů

Bioflavonoidy jsou rozsáhlou skupinou fenolických látek, které se řadí mezi sekundární metabolity produkované různými druhy rostlin. Mezi bioflavonoidy se řadí více než 4000 druhů látek: flavony, flavonoly, chalkony, flavanony, isoflavonoidy, anthokyanidiny a další [55-57]. Tyto látky jsou velmi dobré antioxidanty, vykazují protizánětlivé a antihepatotoxické účinky, jejich příjem je spojován s ochranou proti různým nemocem zahrnující virové infekce, onemocnění srdce a cév [58-62]. Patří mezi důležité rostlinné pigmenty vyskytující se v čaji, plodech malin, rybízu, grapefruitů, oliv, rajčat, černého jeřábu, ostropestřece mariánského, vína, v listech rostlin např. ve špenátu, kapustě, kručince barvířské, řešetláku počistivém nebo koriandru setém a to buď ve formě volné nebo jako glykosidy [Přílohy **P1–P10** a reference tamtéž]. Díky své barevnosti se tyto látky již od počátku 16. století používaly také pro barvení textilií, tapisérií a dalších uměleckých děl [63]. Mnohé oxidační produkty bioflavonoidů mohou vykazovat vyšší antioxidační a cytoprotektivní účinky než původní látky [64].

Oxidační mechanismus flavonoidů byl v posledních 20 letech rozsáhle studován a bylo publikováno velké množství článků s různými kontroverzními závěry. Tyto práce se lišily jak v uváděném počtu elektronů, které se účastní oxidace nejznámějšího flavonoidu quercetinu, tak v navrhovaných nicméně neprokázaných produktech oxidace [reference v Přílohách **P1** a **P3**]. Významným přínosem autorky k tématu bylo určení oxidačního mechanismu quercetinu a určení počtu účastnících se elektronů za zvolených podmínek (pH roztoku). Oba články (Přílohy **P1** a **P3**) získaly velký ohlas zřejmý z jejich citovanosti. Díky snadné oxidaci flavonolů za laboratorních přirozených podmínek se také lišily údaje o jejich fyzikálně-chemických vlastnostech, například hodnoty pK_{a1} quercetinu se v literatuře liší v rozmezí od 5,7 do 9,0. Příloha **P2** vysvětluje oxidační mechanismus quercetinu a luteolinu a přináší hodnoty pK_{a1} a pK_{a2} určené v inertní atmosféře argonu a za použití předem odvzdušněných roztoků pufrů. Z výsledků je patrné, že flavonoidy v roztocích připravených běžným způsobem za laboratorních podmínek jsou nestabilní a přípravě roztoků flavonoidů pro fyzikálně-chemická nebo analytická měření musí být věnována patřičná pozornost. Produkty oxidace flavonolů byly nalezeny za pomoci UV-Vis spektroeletrochemie a analytických technik.

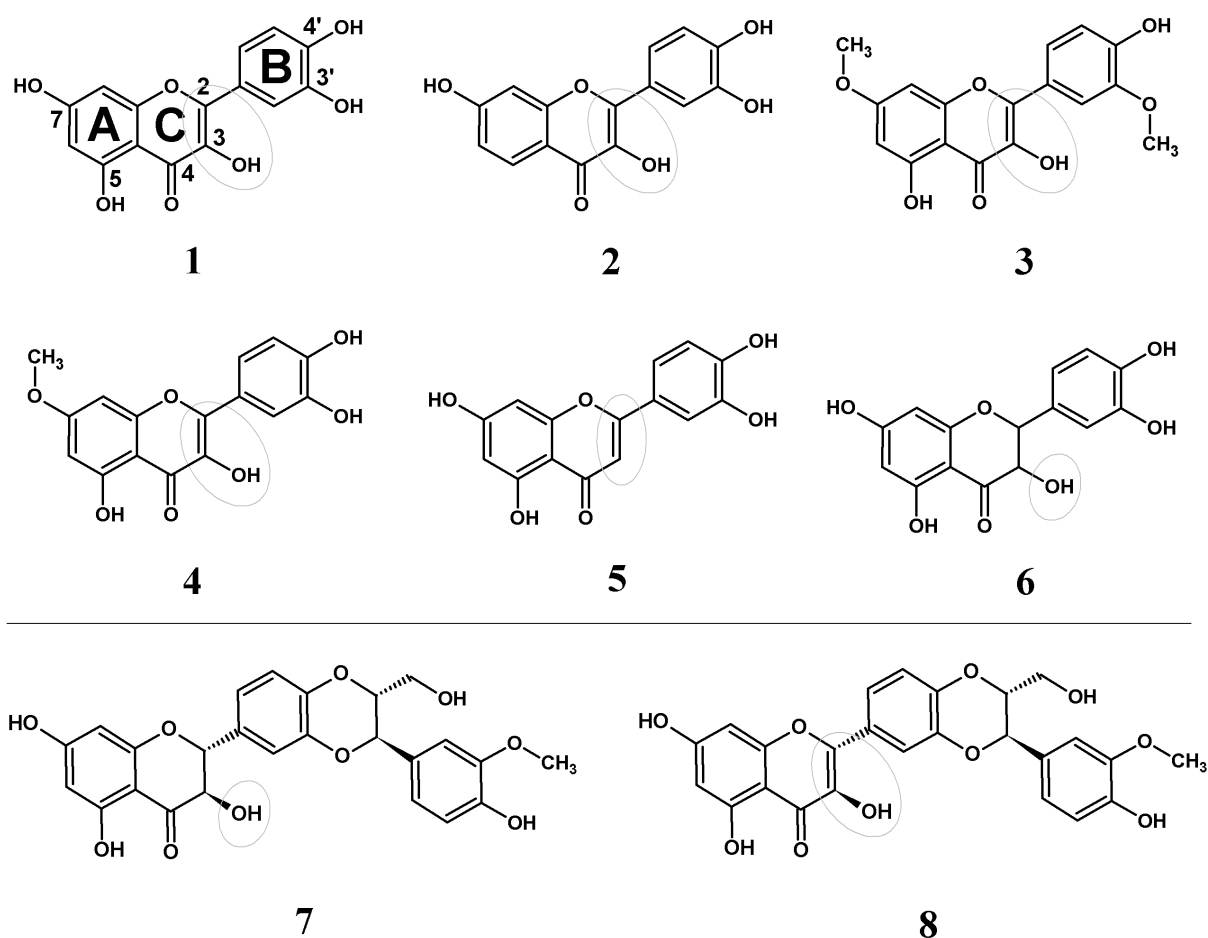


Schéma 1. Chemická struktura flavonolů quercetinu **1**, fisetinu **2**, rhamnazinu **3** a rhamnetinu **4**, flavonu luteolinu **5**, flavanonu taxifolinu **6**, flavonolignanů silybinu **7** a 2,3-dehydrosilybinu **8**. Přítomnost dvojné vazby mezi atomy C2 a C3 a hydroxylové skupiny vázané na atom C3 je vyznačena.

Do souboru publikací této práce byly zařazeny publikace věnující se oxidaci flavonolů, tj. hydroxylovaných derivátů 2-fenyl-1,4-benzopyronu, které obsahují ve své chemické struktuře skupinu OH v poloze 3 (Přílohy **P1–P3** a **P5–P7**). Chemickou strukturu těchto látek ukazuje Schéma 1. Jejich oxidační mechanismus byl porovnán s látkami, které tuto C3–OH skupinu nemají (flavon luteolin **5**, Přílohy **P2** a **P4**) a s látkami, které nemají ve své chemické struktuře dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku C2 a C3 (flavanon taxifolin **6**, Příloha **P8**). Bylo zjištěno, že oxidační mechanismus těchto látek se významně vzájemně liší.

3.1.1 Mechanismus oxidace flavonolů

Výzkum uvedených flavonoidů vysvětlil kontroverzní údaje v literatuře týkající se počtu elektronů účastnících se při oxidaci. Oxidační mechanismus flavonolů v kyselém a neutrálním prostředí, za podmínek daných disociačními rovnovahami, kdy se v roztocích vyskytují pouze forma nedisociovaná AH₂ nebo příslušný anion AH⁻, zahrnuje přenos 2e⁻/2H⁺ nebo 2e⁻/1H⁺ za vzniku chinoidního meziprojektu. Tato dvouelektronová oxidace je následovaná chemickou reakcí nukleofilní adicí vody, dochází dále k otevření kruhu C a poté ke vzniku derivátu benzofuranonu. Tento oxidační mechanismus popisují přílohy **P1**, **P3**, **P5**, **P6**, **P7** a **P11** a byl prokázán pro všechny studované flavonoly obsahující dvojnou vazbu mezi atomy C2 a C3 a současně C3–OH skupinu (látky **1–4**, Schéma 1). Dále bylo zjištěno, že v alkalických roztocích, kdy je disociována další hydroxylová skupina, je přítomný dianion A²⁻ oxidován reverzibilně jedním elektronem za vzniku příslušného radikálu A[•] a dochází k tvorbě nestabilního dimeru. K tomuto oxidačnímu ději dochází v případě quercetinu **1**, fisetinu **2** a rhamnetinu **4** (Přílohy **P3**, **P6** a **P7**), nikoliv v případě rhamnazuinu **3** (Příloha **P5**). Na přítomnost chinoidního meziprojektu při oxidaci ukázala UV-Vis spektroeletrochemie v prostředí acetonitrilu (Příloha **P1**). V tomto prostředí bylo také zjištěno, že oxidace probíhá ve dvou po sobě jdoucích jednoelektronových krocích, které mají blízké redoxní potenciály (rozdíl 35,6 mV) a výsledná vlna má sice výšku dvouelektronové vlny, ale vlastnosti vlny jednoelektronové dané logaritmickou analýzou se směrnici 59 mV na dekádu.

UV-Vis spektroeletrochemie přispěla také k objasnění oxidačního děje, ke kterému dochází při potenciálu druhé oxidační vlny. Bylo prokázáno, že dochází k poklesu absorpce absorpčního pásu při 288 nm oxidačního produktu derivátu benzofuranonu (Příloha **P1**). Jak ukazuje příloha **P2**, k oxidaci quercetinu dochází také chemickou reakcí s kyslíkem za vzniku stejného oxidačního produktu. Tento oxidační produkt není stálý a dochází k jeho rozkladu na další hydroxyloučeniny. Derivát benzofuranonu byl nalezen jako hlavní oxidační produkt také při vzdušné oxidaci roztoků flavonolů fisetinu **2**, rhamnazuinu **3** a rhamnetinu **4** (Přílohy **P5**, **P6** a **P7**). Jako minoritní produkty byly identifikovány také tzv. otevřené struktury se čtyřmi možnými koncovými funkčními skupinami buď aldehydicou –CHO nebo (oxo)aldehydicou skupinou –(CO)CHO a karboxylovou –COOH nebo (oxo)karboxylovou kyselinou –(CO)COOH. Tyto oxidační produkty shrnuje práce Sokolová et al [65] a byly publikovány dalšími autory [66]. Jak ukazuje příloha **P5**, byl vedle hlavního oxidačního produktu benzofuranonu nalezen minoritní oxidační produkt s otevřenou chemickou strukturou 2-hydroxy-6-(4-hydroxy-3-methoxybenzoyloxy)-4-methoxyfenyl-2-oxooctová kyselina jako produkt vzdušné oxidace

ramnazinu **3**. V roztocích fisetinu **2** byl identifikován kromě benzofuranonu také 2-[(3,4-dihydroxybenzoyl)oxy]-4-hydroxybenzaldehyd a příslušná kyselina ([65], Příloha **P6**). V případě rhamnetinu došlo v přítomnosti kyslíku ke vzniku minoritního produktu s podobnou otevřenou strukturou 2-[(3,4-dihydroxybenzoyl)oxy]-6-hydroxy-4-methoxyfenyl-2-oxooctové kyseliny (Příloha **P7**). Oxidace látek, které nesplňují podmínku přítomnosti hydroxylové skupiny v poloze C3 nebo nemají dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku C2 a C3, probíhá jiným způsobem.

3.1.2 Mechanismus oxidace flavonu luteolinu a flavanonu taxifolinu

Mechanismus oxidace luteolinu **5** (Schéma 1) se liší výrazně od oxidace flavonolů uvedených výše díky absenci C3–OH skupiny. Dvouelektronovou oxidací dochází ke vzniku chinonu na aromatickém kruhu B (Příloha **P4**). Reakční schéma připomíná "schema carré", které publikoval Jacq pro redukci organických sloučenin [21]. Vztah elektronového přenosu a disociačních reakcí pro oxidaci ukazuje schéma 2. Cyklické voltamogramy naměřené v příloze **P4** jsou charakterizovány jako kinetické proudy díky vlivu protolytických reakcí. Také pro luteolin byly nalezeny další minoritní produkty uvedené v příloze **P4** včetně látek s otevřenou chemickou strukturou [65].

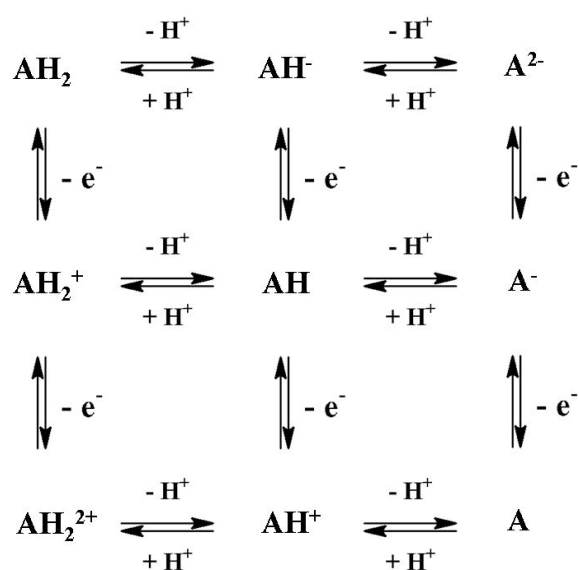


Schéma 2. Čtvercové schéma souvislosti mezi víceelektronovou oxidací sloučeniny AH_2 a její disociací na anion AH^- a dianion A^{2-} .

Další látkou patřící mezi bioflavonoidy je taxifolin **6** (Schéma 1). Jeho chemická struktura je podobná quercetinu, nicméně jde chemicky o flavanon, který nemá dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku C2 a C3. Z podrobného elektrochemického výzkumu pomocí technik

cyklické voltametrie a coulometrie bylo zjištěno, že první oxidační vlna taxifolinu je dvouelektronový ECE proces (Příloha P8). K určení oxidačního mechanismu této látky významně přispěla *in situ* IČ spektroeletrochemie. Bylo zjištěno, že intenzita ani vlnočet absorpčního pásu příslušející vibraci oxo skupiny na uhlíku C4 se během oxidace látky nemění. To by ukazovalo na fakt, že aromatické kruhy C a A nejsou při oxidaci dotčeny. Zároveň byly zaznamenány nové absorpční pásy vibrací *o*-chinonu při 1671 a 1695 cm⁻¹. Měření bylo prováděno v deuteriovaném acetonitrilu CD₃CN. *In situ* IČ spektroeletrochemie také ukázala, že dochází ke snížení typických absorpčních pásů vody, která se ve stopovém množství v roztoku nacházela. Tato informace vedla k nalezení 2'-hydroxytaxifolinu jako produktu oxidace, kdy po dvouelektronovému přenosu dochází k následné chemické reakci s vodou (výsledný mechanismus je tedy ECEC).

3.1.3 Mechanismus oxidace flavonolignanů

Oxidací bioflavonoidů silybinu **7** a 2,3-dehydrosilybinu **8** se zabývají přílohy P9 a P10. Tyto látky patří mezi flavonolignany a nacházejí se v plodech ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*), z něhož bývají extrahovány ve směsi nazvané silymarin. Tento rostlinný extrakt je znám pro své antioxidační a hepatoprotektivní účinky [67,68]. Tyto látky ve své chemické struktuře obsahují chemickou strukturu flavanonu (v případě silybinu **7**) nebo chemickou strukturu flavonolu (pro 2,3-dehydrosilybin **8**) a lignanu fenylypropanoidu (Schéma 1). Cyklická voltametrie silybinu v prostředí acetonitrilu poskytovala dvě jednoelektronové vlny do potenciálu 1,9 V oproti argentschloridové elektrodě. Počet elektronů odpovídal náboji spotřebovanému při coulometrii. Směrnice získaná z logaritmické analýzy semiintegrovaných proudů první oxidační vlny také ukazovala na jednoelektronový kvazireverzibilní proces. Tvar cyklického voltamogramu a nezávislost potenciálu píku na koncentraci, dále posun potenciálu píku s rychlostí skenu $\delta E_p/\delta \log v$ ukazoval na jednoelektronový EC proces. Přítomnost radikálu silybinu byla dokázána pomocí *in situ* EPR spektroeletrochemie a k objasnění oxidačního mechanismu významně přispěla *in situ* IČ spektroeletrochemie. Absorpční spektrum získané během oxidace při potenciálu první oxidační vlny ukazuje, že absorpční pás C=O vibrace při 1643 cm⁻¹ zůstal nezměněn. Z tohoto vyplývá, že nedochází ke změnám chemické struktury na kruhu C, podobně jako v případě oxidace taxifolinu. Navíc, byl zaznamenán růst nového absorpčního pásu hydroxylové skupiny při 3446 cm⁻¹ za současného poklesu typických absorpčních pásů vody, která se ve stopovém množství v roztoku nacházela. Na základě výsledků z IČ spektroeletrochemie a také MS/MS analýzy byl navržen oxidační mechanismus, kdy po

jednoelektronové oxidaci dochází k reakci s vodou a vzniku hydroxylovaného produktu (Příloha P9). Neprokázala se tvorba 2,3-dehydrosilybinu jako možného produktu oxidace silybinu, jehož infračervené absorpční spektrum bylo změřeno za stejných podmínek.

Příloha P10 se věnuje oxidaci 2,3-dehydrosilybinu **8**, která vede ke tvorbě příslušného derivátu benzofuranonu jako v případě výše uvedených flavonolů. Cyklická voltametrie 2,3-dehydrosilybinu poskytuje tři oxidační vlny. Podrobným zpracováním elektrochemických dat bylo zjištěno, že první oxidační vlna je dvouelektronová, logaritmická analýza semiintegrovaných proudů poskytla výsledek směrnice 40 mV/ dekádu. Druhá jednoelektronová oxidační vlna se směrnicí 80 mV/dekádu byla připsána oxidaci produktu vznikajícího na 1. oxidační vlně. Standard derivátu benzofuranonu se oxidoval při potenciálu druhé oxidační vlny 2,3-dehydrosilybinu a navíc absorpční spektrum této látky měřené za stejných podmínek in situ IČ spektroeletrochemie při potenciálu první oxidační vlny bylo stejné. Diagnostická kritéria pro reakční schéma ECE-DISP byla splněna (výsledky $\delta E_p/\delta \log v = 29,6$ mV a $\delta E_p/\delta \log c = 29,6$ mV). Fakt, že po elektronovém přenosu dochází k reakci s vodou byl zjištěn také díky přidávkám vody do roztoku, docházelo k posunu potenciálu k nižším hodnotám a usnadnění oxidačního děje (Příloha P10).

3.2. Elektrochemie hydroxychinolinových derivátů

3.2.1 Mechanismus oxidace derivátů hydroxychinolinu

Přehled literatury ukázal, že deriváty hydroxychinolinu vykazují biologickou aktivitu a jsou i při použití v netoxických koncentracích potenciálními inhibitory integrasy HIV-1 viru v buněčných kulturách [69]. Příloha P12 se zabývá elektrochemií a spektroeletrochemií šesti derivátů 8-hydroxychinolinu obsahující navázané různé funkční skupiny –CH₃, –COOH, –Cl v různých polohách chinolinové struktury. Byl zjišťován vliv přítomnosti a polohy funkční skupiny karboxylové kyseliny, která zvyšuje biodostupnost hydroxychinolinu, na mechanismus oxidace. Bylo zjištěno, že oxidační potenciál těchto látek se vzájemně příliš neliší a koreluje s energiemi jejich HOMO orbitalů. Ze získaných cyklických voltamogramů je patrné, že po elektronovém přenosu následuje chemická reakce, tento fakt je také potvrzen nezávislostí $I_p/v^{1/2}$ na rychlosti skenu. Počet elektronů spočítaný z prošlého náboje při coulometrii se pohyboval v rozmezí 0,5 a 0,7 pro všechny látky. Již tento výsledek ukazoval na možnost případné autoprotónizační reakce, jelikož studované látky obsahují ve své chemické struktuře heteroatom dusíku, který může vázat proton H⁺. Jak ukazuje obrázek 4 přílohy P12, cyklický voltamogram se výrazně změnil v přítomnosti externího proton donoru, zde pyridinu. Došlo k posunu

potenciálu píku původní kinetické vlny hydroxychinolinového derivátu k nižším hodnotám. Současně došlo ke zvýšení výšky píku až do výšky, která odpovídá pouze difúzi molekul k povrchu elektrody. Jinými slovy, tato výška odpovídající koncentraci látky u povrchu elektrody není ovlivňována chemickou reakcí, jelikož oxidace probíhá v nadbytku proton akceptoru pyridinu. Stechiometrie oxidačního procesu byla zjištěna experimentálně. Dvouelektronová oxidace v přítomnosti pyridinu byla potvrzena pomocí coulometrie. Ze závislosti $\delta E_p / \delta \log c_{Py} = 59 \text{ mV}$ bylo určeno, že oxidačního děje se účastní stejný počet protonů a elektronů [24]. Také byl vyloučen možný mechanismus tzv. vnitřního přenosu protonu v molekule PCET (proton coupled electron transfer), který se nemohl uplatnit u studovaných látek z geometrických důvodů, mezi hydroxylovou skupinou a atomem dusíku nedochází ke tvorbě vodíkové vazby. Významným přínosem *in situ* IČ spektroeletrochemie bylo odhalení absorpčních pásů obou vznikajících produktů oxidace tj. jak oxidačního produktu tak protonované původní látky. Bylo potvrzeno, že protonovaná původní látka se oxiduje až při potenciálu druhé oxidační vlny. Článek **P12** vyčísluje stechiometrii celého děje a ukazuje na to, že v nepřítomnosti externího proton akceptoru dochází k dvouelektronové oxidaci pouze jedné molekuly látky ze tří, ostatní dvě molekuly původní látky slouží jako proton akceptor. Je evidentní, že v přítomnosti jiných dusíkatých heterocyklických sloučenin v organismu se hydroxychinoliny budou oxidovat snadněji a tento fakt může ovlivnit jejich bioaktivní účinek.

3.2.1 Oxidace a redukce derivátů hydroxychinolinu obsahující azo skupinu

Azohydroxychinoliny se používají jako barviva a vytvářejí různě barevné cheláty s kationty kovů [70,71]. Bylo zjištěno, že tyto látky vykazují také antimikrobiální vlastnosti [72]. Článek v příloze **P13** řešením mechanismu oxidace a redukce navázal na předchozí publikaci, která charakterizovala fyzikálně chemické, spektroskopické vlastnosti nově syntetizovaných azochinolinových sloučenin, také vztah mezi potenciály oxidace/ redukce a odolností proti blednutí barviv nanesených na textilním materiálu [73]. Oxidační mechanismus těchto látek zahrnuje účast dvou elektronů, dvou protonů a následnou chemickou reakci nukleofilní adice vody za vzniku hydroxylované molekuly v *ortho*-poloze od skupiny OH (Příloha **P13**). UV-Vis spektroeletrochemie ukázala přítomnost meziprojektu radikál anionu a výsledné absorpční spektrum je podobné absorpčnímu spektru katecholu. IČ spektroeletrochemie v tomto případě neposkytla příliš informací, jelikož chemická struktura oxidačního produktu se liší pouze v přítomnosti další hydroxylové skupiny, jejíž vibrace je skrytá v širokém absorpčním pásu mezi 3450 a 3700 cm^{-1} . Pouze změny absorpčního spektra naměřené v oblasti 1220-1280 cm^{-1}

(vibrace $-C=N-C-$ chinolinu) a snížení absorpčního pásu při vlnočtu 3003 cm^{-1} (vibrace $C7-H$) jsou jasně patrné, i když při této technice se měří malé změny na pozadí silné absorpce rozpouštědla. Právě v poloze na atomu uhlíku $C7$ dochází k hydroxylaci.

Cyklická voltametrie látky **HOR-N=N-Ph** (2-methyl-5-[(E)-fenyldiazenyl]-chinolin-8-ol) v acetonitrilu poskytla pět redukčních vln v rozmezí potenciálů od 0,6 do 1,8 V proti $Ag|AgCl|1M\ LiCl$ referentní elektrodě. Ukázalo se, že vlna IIc je adsorpční povahy, zatímco všechny ostatní byly difúzí řízené a jejich výška lineárně rostla se zvyšující se koncentrací látky. Podrobnou elektrochemickou studií v přítomnosti slabého a silného proton donoru (3-chloro-4-hydroxy-benzonitrilu a dihydrátu tetraoxalátu draselného [74]) a slabého a silného proton akceptoru (pyridinu a tetrabutylammonium hydroxidu) byly ostatní čtyři redukční vlny přiřazeny redukčním dějům různých disociačních forem studované látky (Schéma 3). Bylo zjištěno, že získané proudy první redukční vlny jsou kinetické povahy. Náboj spotřebovaný při elektrolýze odpovídal 0,75 elektronu na jednu molekulu látky.

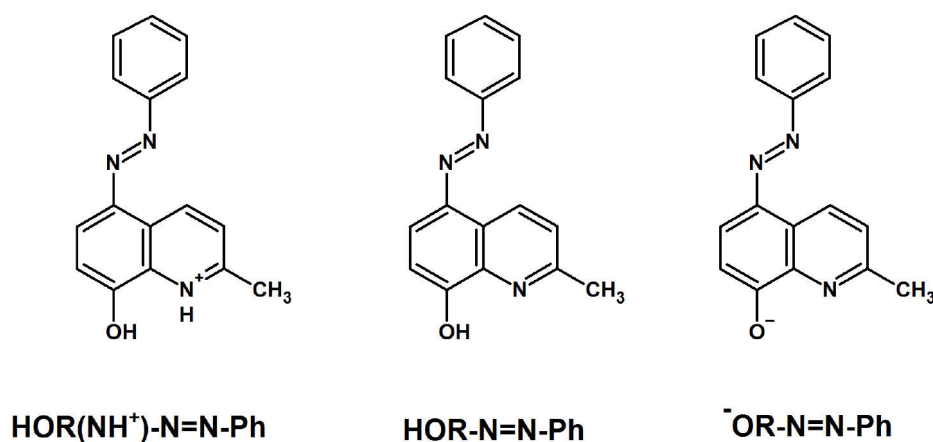


Schéma 3. Chemická struktura protonačních/ disociačních forem látky **HOR-N=N-Ph**.

Jak ukazuje příloha **P13**, první redukční vlna Ic byla přiřazena dvouelektronové redukci formy protonované na dusíku chinolinového kruhu a vedla ke vzniku hydrazosloučeniny. Další redukční vlna IIIc odpovídá dvouelektronové $2e^-/2H^+$ redukci neutrální molekuly. Poměr jejich výšek odpovídá rovnováze obou disociačních forem v roztoku. Redukce při potenciálech obou redukčních vln vedla ke vzniku příslušné hydrazosloučeniny **HOR-NHNH-Ph**. Tato látka podléhá jedoelektronové redukci při potenciálu vlny IVc a její anion **⁻OR-NHNH-Ph** poskytuje jedoelektronovou vlnu Vc. K vyřešení mechanismu redukce významně přispělo měření *in situ* IČ spektroeletrochemie. Vibraci $N-H$ tvořící se hydrazoskupiny (široký pás při

3365 cm^{-1}) bylo možné odlišit od vibrace N-H protonovaného dusíku na chinolinovém kruhu při 3211 cm^{-1} . Hydrazoskupina se projevila také širokými absorpčními pásy při 1602 a 1597 cm^{-1} a v oblasti otisku prstu při 1270, 1215 a 1197 cm^{-1} . Současně absorpční pás azoskupiny při 1256 cm^{-1} klesal. Měření *in situ* IČ spektroelektrochemie potvrdilo také chemickou reverzibilitu prvního redukčního děje při zpětném skenu.

3.3. Elektrochemie vybraných derivátů 1,10-fenanthrolinu

Látky obsahující strukturu 1,10-fenanthrolinu, jeho komplexy s kationty kovů, vykazují celou řadu vlastností využitelných v mnoha oblastech chemie jako katalyzátory, elektrochromní a luminiscenční látky, fotosenzitizátory [75]. 1,10-fenanthrolin byl použit jako stavební jednotka pro syntézu látek s možnou biologickou aktivitou pomocí funkcionalizace substituenty jako jsou fenothiazin, pyrrolidin, karbazol a dalšími, které se nacházejí v přírodních produktech, v léčivech a v bioaktivních přípravcích, vykazují také antioxidační, protizánětlivé a antimikrobiální účinky [76-81].

3.3.1 Mechanismus redukce derivátů 1,10-fenanthrolinu substituovaných v poloze 4 a 7

Sloučeniny 1,10-fenanthrolinu zahrnovaly deriváty substituované v polohách 4 a 7 stejným substituentem, buď chloro skupinou (Příloha **P14**) nebo pyrrolidinovým kruhem vázaným přes atom dusíku (Příloha **P15**). Cyklická voltametrie dichlorovaného derivátu poskytla v acetonitrilu celkem čtyři redukční vlny, dvě ireversibilní dvouelektronové vlny odpovídající postupnému odštěpení chloridu z molekuly. Třetí a čtvrtá reversibilní vlna při potenciálech -2,0 V a -2,2 V patřila jedoelektronové redukci fenanthrolinu na radikál anion a dále na dianion. Při potenciálu první redukční vlny dochází k několika krokům znázorněným ve Schématu 4 znázorňující celý ECEC mechanismus, tj. přijetí elektronu za tvorby radikál anionu (E), chemická reakce odštěpení chloridu (C), přijetí elektronu za vzniku anionu (E) a chemická reakce přijetí protonu z rozpouštědla (C). V případě všech pěti dichlorovaných látek studovaných v příloze **P14** lišících se navíc substituenty v polohách 2, 5 a 9 ovlivňujících mírně potenciál redukčních píků, bylo navíc zjištěno, že tento mechanismus odštěpení chloridu je postupný (stepwise), jak bylo zjištěno z hodnoty vypočteného koeficientu přenosu α , jeho hodnota byla vyšší než 0,5. Tento parametr vypočtený z rovnice $|E_{p/2} - E_p| = 1,857 RT/\alpha F$ důležitý pro některé reakční mechanismy může ukazovat na proces, kdy dochází k odštěpení substituentu současně s přenosem elektronu. In situ IČ spektroelektrochemie společně s chromatografickými metodami potvrdila navržený redukční mechanismus.

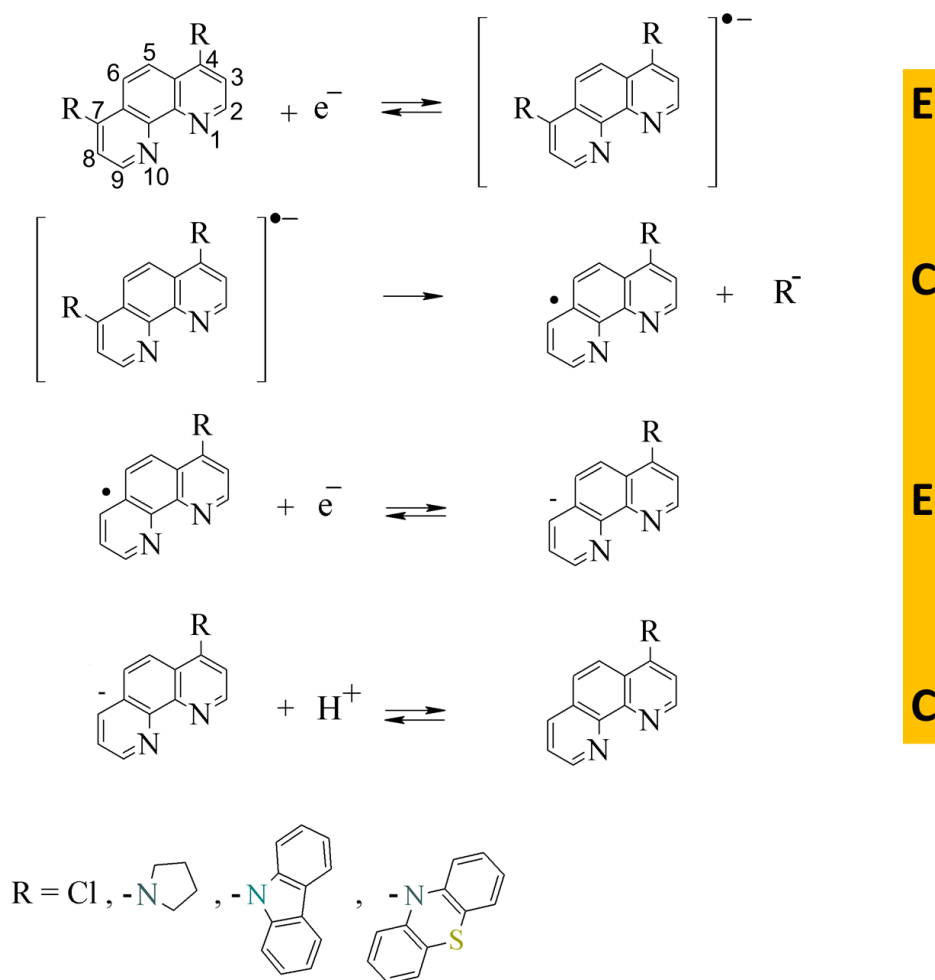


Schéma 4. Obecné schéma redukčního mechanismu ECEC studovaných 1,10-fenanthrolinů. ECEC mechanismus zahrnuje následující kroky: přenos elektronu – chemická reakce – přenos elektronu – chemická reakce.

Podobným redukčním mechanismem dochází k redukci látky obsahující pyrolidin, karbazol a fenothiazin v polohách 4 a 7 (Schéma 4). Analýza cyklických voltamogramů potvrdila navrhované reakční schéma, získané výsledky byly blízké $\delta E_p / \delta \log v = 29,6 \text{ mV}$ a $\delta E_p / \delta \log c = 29,6 \text{ mV}$ (Příloha **P15** a **P17**). Při ECEC redukci dochází k odštěpení pyrolidinového kruhu z molekuly, což bylo potvrzeno nejen chromatografickými metodami, ale také IČ spektroelektrochemií, kdy docházelo k růstu absorpčních pásů typických pro monosubstituovaný derivát fenanthrolinu (Příloha **P15**). Podobný redukční mechanismus byl nalezen také pro látky substituované v polohách 4 a 7 karbazolovým nebo fenothiazinovým kruhem vázaným přes atom dusíku (Příloha **P17**). V obou případech došlo ke vzniku radikál anionu a poté odštěpení substituentu a redukční mechanismus byl dokončen dalším elektronovým přenosem a reakcí

s H^+ . Při potenciálu druhé redukční vlny došlo k odštěpení druhého substituentu z molekuly a vznikl 1,10-fenanthrolin, jehož redukční vlny byly na cyklických voltamogramech také přítomny.

3.3.2 Oxidace derivátů 1,10-fenanthrolinu substituovaných v poloze 4 a 7

Oxidace látek diskutovaných v kap. 3.3.1 probíhala vzájemně odlišným způsobem, díky povaze substituentů vázaných v poloze 4 a 7. V případě 4,7-dichloro-1,10-fenanthrolinu cyklická voltametrie poskytla dvě oxidační vlny, nicméně jejich podrobná analýza nepřinesla výsledky použitelné k určení oxidačního reakčního schématu. Ukázalo se, že při elektrolýze při potenciálu za první oxidační vlnou došlo ke spotřebě jednoho elektronu a poklesu výšky píku cyklického voltamogramu, nicméně nebyly nalezeny žádné oxidační produkty pomocí HPLC-DAD. Teprve *in situ* UV-Vis spektroeletrochemie ukázala na chemickou reverzibilitu oxidačního procesu, kdy během reredukce vznikajícího produktu bylo zaznamenáno původní absorpční spektrum látky (Příloha P14). Významný přínos k odhalení mechanismu oxidace měla IČ spektroeletrochemie, která přinesla reverzibilní změnu absorpčních spekter ve prospěch vznikajícího dimeru v poloze 2.

Cyklická voltametrie látky 4,7-di(pyrolidin-1-yl)-1,10-fenanthrolinu poskytuje tři oxidační vlny, z nichž druhá vykazuje adsorpční vlastnosti. Podrobným zkoumáním parametrů první dvouelektronové oxidační vlny bylo zjištěno, že se uplatňuje ECE oxidační mechanismus a následuje reakce s vodou za tvorby hydroxylovaného derivátu v *ortho* poloze od atomu dusíku pyrilidinového kruhu. I když v absorpčním spektru po oxidaci látky nebyl zjištěn absorpční pás vibrace nové OH skupiny (skryta v širokém absorpčním pásu vody), poskytla *in situ* IČ spektroeletrochemie nárůst nových absorpčních pásů příslušející vznikající látce a pokles absorpčních pásů látky původní. Bylo zjištěno, že při potenciálu druhé oxidační vlny dochází k oxidaci fenanthrolinového kruhu a ke tvorbě hydroxylovaného derivátu v poloze 5. Pomocí HPLC-MS/MS byly identifikovány další minoritní rozkladné produkty (Příloha P15).

Vlastnosti oxidační vlny 4,7-di(karbazol)-1,10-fenanthrolinu, které byly zjištěny za podmínky, kdy oxidační děj byl řízen difúzí, ukazovaly na reakční schéma EC2 (analýza cyklických voltamogramů poskytuje výsledky $\delta E_p/\delta \log v = 19,7$ mV a $\delta E_p/\delta \log c = 19,7$ mV za podmínky, kdy počáteční přenos elektronu je rychlý). Znamená to, že při elektronovém přenosu vzniká radikál kation a ten podléhá bimolekuární chemické reakci, pravděpodobně dimerizaci. Přehled literatury týkající se oxidace karbazolových derivátů ukázal, že karbazolové deriváty mohou vytvářet při oxidaci dimery [82,83]. *In situ* UV-Vis spektroeletrochemie podpořila tuto

možnost, při oxidaci došlo k růstu absorpčních pásů při 210, 231, 277 a 388 nm tvorby radikál kationu. Při potenciálu druhé oxidační vlny bylo zjištěno zvýšení pásu při 410 nm a absorbance širokého pásu při 720 nm. Naskýtá se možnost tvorby biradikál dikationu vyskytujícího se na dvou různých oxidačních centrech karbazolu v molekule monomeru nebo dimeru [84] podobně jako byl zjištěn v literatuře absorpční pás odpovídající dikationu tetrafenylbenzidinu při 700 nm [85] (Příloha P17).

Cyklická voltametrie derivátů 1,10-fenanthrolinu substituovanými dvěma funkčními skupinami fenothiazinu v polohách 4 a 7 ukázala jednu reverzibilní oxidační vlnu při potenciálu 1,1 V. Logaritmická analýza semiintegrovaných proudů poskytla hodnotu směrnice 105 mV/dekádu. S využitím dalších informací o tomto oxidačním ději bylo určeno, že v tomto případě jde o dva po sobě jdoucí jednoelektronové procesy s rozdílem potenciálů 62 mV (Příloha P17). Tento efekt naznačoval, že by mohlo jít o oxidaci dvou navzájem komunikujících elektroaktivních center nacházejících se na obou substituentech fenothiazinu. Znamenalo by to, že dojde k růstu absorpčního pásu v oblasti blízké infračervené oblasti (NIR) při oxidaci prvním elektronem a následně poklesu tohoto pásu při dokončení děje druhým elektronem. Nicméně při měření NIR spektroeletrochemie v oblasti 1000–2500 nm za daných podmínek žádná výrazná změna v absorpčním spektru nenastala ani pro jeden derivát, k výrazné komunikaci mezi oxidačními centry nedochází. K oxidaci fenothiazinu na jeho sulfoxid dojde při potenciálu druhé oxidační vlny, jak ukázala IČ spektroeletrochemie (charakteristický absorpční pás vibrace funkční skupiny S=O při 1037 cm⁻¹ (Příloha P17).

3.4. Charakteristika nových umělých enzymů

Příloha P18 se zabývá vývojem a charakterizací nových komplexů mědi se strukturním motivem tyrosinázy, které byly navrženy s cílem nahradit nestabilní enzym tyrosinázu při katalyzované oxidaci katecholů.

Jelikož při oxidaci katecholu za přítomnosti kyslíku dochází po navázání katecholu na aktivní místa dvojmocných atomů mědi, poté k redukci atomu mědi z oxidovaného stavu 2+ na oxidovaný stav 1+, byla k vysvětlení mechanismu reakce využita UV-Vis spektroeletrochemie. Bylo zjištěno, že absorpční spektrum zkoumaných dvoujaderných komplexů **R-Cu(II)Cu(II)-R** se liší od absorpčního spektra jejich redukováných komplexů **R-Cu(II)Cu(I)-R** a **R-Cu(I)Cu(I)-R**. Významnou informací bylo zjištění, že redukční děj je chemicky reverzibilní a

primárně dochází k redukci/oxidaci atomů mědi nikoliv organických ligandů. Organické ligandy se redukují nebo oxidují ireverzibilně při vyšších potenciálech v absolutní hodnotě. Chemická reverzibilita je důležitou vlastností katalyzátoru. *In situ* UV-Vis spektroelektrochemie přinesla také informaci o absorpčních spektrech a oxidačních potenciálech látek účastnících se katalyzované reakce, tj. 3,5-di-*tert*-butylcatecholu, oxidací vznikajícího 3,5-di-*tert*-butylchinonu a také trihydroxyderivátu 1,2,3-trihydroxy-4,6-*tert*-butylbenzenu. Přínosem článku v příloze **P18** je odhalení mechanismu katalytického účinku studovaných komplexů, kdy tvorba chinonu byla kontrolována pomocí vloženého potenciálu a byla současně sledována absorpční spektra reagujících látek.

Dalším výsledkem bylo zjištění, že jednojaderný komplex mědi není pro katalýzu kvůli interferenci rostoucího absorpčního pásu při 475 nm během redukce vhodný. Při vlnové délce 400 nm se při této technice sleduje tvorba vznikajících chinonů.

4. ZÁVĚR

Předkládaná habilitační práce shrnuje publikace zabývající se řešením oxidačních a redukčních mechanismů bioaktivních látek v Přílohách **P1–P18**.

Práce ukazuje využití základních elektrochemických principů a shrnuje klíčové aspekty při řešení komplikovaných oxidačních a redukčních mechanismů. Na základě podrobného matematického zpracování naměřených závislostí proud – potenciál je možné určit elektrochemické chování látek a rozlišit reakční schémata zahrnující přenos elektronu a účast spřažených chemických reakcí. Přínosem k tématice je použití spektroelektrochemických metod. Je podtržen význam UV-Vis spektroelektrochemie pro určení přítomnosti spřažených dějů a vzniku nestálých reakčních meziproductů a také pro zjištění chemické reverzibility dějů. Práce ukazuje využití IČ spektroelektrochemie k určení elektroaktivního místa v molekule, a to sledováním vzniku nových absorpčních pásů při vkládání potenciálu. Novým přístupem je také, za vhodných experimentálních podmínek, sledování případného poklesu absorpčních pásů přítomných stop vody, která se často redox děje účastní. Přínosem všech vybraných publikací je určení redoxních mechanismů studovaných látek a nalezení jejich prvních reakčních meziproductů, které mohou být základem pro jejich biotransformace, kdy v biochemických přeměnách dochází k přenosu elektronu nebo protonu. Objasnění mechanismu oxidace studovaných bioaktivních látek získalo ohlas na mezinárodních konferencích a práce mají významný počet citací bez autocitací. Příloha **P2** je citována 71x, příloha **P3** má 90 citací bez autocitací, přílohy **P1** a **P4** více než 30, přílohy **P8** a **P11** nad 15 citací. Příloha **P16** ukazuje podrobný návod a manuál, jak použít cyklickou voltametrii, UV-Vis spektroelektrochemii a další metody k určení redoxního mechanismu bioaktivních látek komplexovaných s cyklodextriny.

Rozvoj rychlých spektroelektrochemických technik je nadále žádané. Perspektiva do budoucnosti spočívá také ve zdokonalení spojení s fluorescenční spektrometrií, která klade nároky na geometrii spektroelektrochemické cely. Principy důležité pro určení oxidačních a redukčních mechanismů je nutné předávat dalším generacím vědeckých pracovníků, o co se RNDr. Romana Sokolová, PhD. snaží nejen ve svých přednáškách fyzikální chemie a oxidačních a redukčních mechanismů organických látek, ale také osobním přístupem v roli školitele bakalářských, magisterských a doktorandských prací.