

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

**Využití**  
**elektroanalytických metod**  
**při studiu farmak**

Habilitationální práce

Karel Nesměrák

Praha 2017

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>4</b>
	Literatura .....	6
<b>2</b>	<b>Elektroanalytické metody v průtokové injekční analýze farmak</b> .....	<b>7</b>
2.1	Průtoková injekční analýza .....	7
2.2	FIA stanovení fenothiazinů .....	11
2.2.1	FIA titrační stanovení fenothiazinů ve vodném micelárním a nevodném prostředí .....	15
2.2.2	FIA spektrofotometrické stanovení fenothiazinů po jejich fotochemické, chemické nebo elektrochemické oxidaci .....	17
	Literatura .....	18
<b>3</b>	<b>Elektroanalytické metody v predikci metabolického osudu farmak</b> .....	<b>26</b>
3.1	Elektroanalytická chemie a metabolismus .....	26
3.2	Studované látky .....	29
3.2.1	Deriváty thioakridinu .....	30
3.2.2	Deriváty benzoxazinu .....	31
3.2.3	Deriváty 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolu .....	32
3.2.4	Deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridinu .....	33
	Literatura .....	34
<b>4</b>	<b>Elektroanalytická data v QSAR</b> .....	<b>37</b>
4.1	Vztahy mezi strukturou a vlastnostmi chemických látek .....	37
4.2	Vztah oxidačně-redukčního potenciálu a struktury .....	41
4.3	Studované látky .....	44
4.3.1	Deriváty benzoxazinu .....	44
4.3.2	Deriváty 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolu .....	45
4.3.3	Deriváty <i>N</i> -benzylsalicylthioamidu .....	46
4.3.4	Deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridinu .....	47
	Literatura .....	47
<b>5</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Přehled publikovaných prací</b> .....	<b>55</b>
6.1	Kapitoly v knihách .....	55
6.2	Původní vědecké práce v impaktovaných časopisech .....	56
6.3	Přehledové články v impaktovaných časopisech .....	58
6.4	Jiné publikace v impaktovaných nebo recenzovaných časopisech .....	59
	<b>Přílohy</b> .....	<b>60</b>

## Seznam symbolů a zkratk

$a_i$	regresní váha $i$ -ého parametru
ASCII	americký standardní kód pro výměnu informací (American Standard Code for Information Interchange)
$b$	úsek lineární regrese, resp. ve vztahu (4.5) aktivita základní (nesubstituované) sloučeniny
BA	biologická aktivita
$C$	chemická struktura látky
$E_{1/2}$	půlvlnový potenciál [V]
$(E_{1/2})_H$	půlvlnový potenciál nesubstituovaného derivátu [V]
$(E_{1/2})_X$	půlvlnový potenciál substituovaného derivátu [V]
$F$	Faradayova konstanta [96 485 C mol <sup>-1</sup> ]
FIA	průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis)
$G_i$	příspěvek funkční skupiny (strukturního motivu) k aktivitě látky
HOMO	nejvyšší obsazený molekulový orbital (Highest Occupied Molecular Orbital)
$I$	indikátorová konstanta přítomnosti funkční skupiny nebo strukturního motivu v molekule
$k_H$	rychlostní (nebo rovnovážná) konstanta reakce nesubstituovaného derivátu
$k_X$	rychlostní (nebo rovnovážná) konstanta reakce substituovaného derivátu
LFER	lineární vztah Gibbsovy energie (Linear Free Energy Relationship)
LOQ	limit kvantifikace
$n$	počet vyměňovaných elektronů
QSAR	kvantitativní vztahy mezi strukturou a aktivitou (Quantitative Structure-Activity Relationships)
QSER	kvantitativní vztahy mezi strukturou a elektrochemií (Quantitative Structure-Electrochemistry Relationships)
$r^2$	koeficient determinace
$R$	universální plynová konstanta [8,314 J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]
SAM	samoskladná monovrstva (self-assembled monolayer)
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry Specification (český výraz se nepoužívá)
$T$	termodynamická teplota [K]
$x_e$	parametr elektronových vlastností
$x_h$	parametr hydrofobicity (lipofility)
$x_n$	parametr $n$ -té vlastnosti
$x_s$	parametr sterických vlastností
$\rho$	reakční konstanta
$\sigma$	Hammettova konstanta substituentu
$\Phi$	obecná fyziologická aktivita látky

## 1 Úvod

Cestu k analytické chemii mi otevřel můj zájem o léčiva a farmacii. Tento motiv zůstává přítomný i v mém profesním zaměření. Ve své habilitační práci tak předkládám komentovaný výběr z prací, které jsem publikoval v letech 2002–2016, jejichž společným prvkem je zaměření na analýzu farmak, ať již v pravém slova smyslu ke stanovení účinných látek v léčivých přípravcích, nebo aplikaci metod analytické chemie k pochopení účinku farmak či popisu jejich analytického chování. I ostatní mé práce se převážně týkají analýzy farmak, avšak spadají do oblasti separačních nebo spektrálních metod; uvádím je pouze v přehledu publikovaných prací.

V současné době, kdy řešení běžných analytických problémů dominují separační či spektrometrické analytické metody, dochází k jistému posunu významu a využití metod elektroanalytických [1]. Vedle svého původního poslání, spočívajícího v možnostech stanovení velmi nízkých koncentrací analytů, jsou nezastupitelné jako detekční technika především v proudících tekutinách. Významně se také uplatňují při studiu mechanismů chemických a elektrochemických reakcí, zejména jako metody k přípravě produktů redukčních nebo oxidačních reakcí. Elektroanalytické metody tak zastávají důležité a nenahraditelné místo ve farmacii [2, 3], medicíně [4], potravinářství [5, 6], životním prostředí [7, 8], tedy v oblastech, které se reálně dotýkají života každého z nás.

V oblasti farmak se elektroanalytické metody uplatňují ve všech oblastech, od výzkumu a vývoje nových farmak, přes jejich výrobu a kontrolu čistoty, až ke studiím mechanismu účinku a metabolických přeměn farmak. Zatímco při kontrolách čistoty farmak či analýze jejich metabolických produktů jsou spíše využívány chromatografické a spektrometrické metody, při vývoji nových farmak a modelování jejich možného metabolického osudu a mechanismu účinku jsou vzhledem ke své podstatě častější metody elektroanalytické. O šťastném vztahu elektroanalytické chemie a farmacie ostatně svědčí objev protinádorových vlastností cisplatin, učiněný náhodně při studiu vlivu

elektrického proudu na růst bakterie *Escherichia coli*. Za podmínek experimentu, prováděném v amoniakálním pufru, vznikal jako oxidační produkt na platinové anodě právě *cis*-diamino-dichlor platnatý komplex, inhibující růst *E. coli* [9, 10].

Studie prezentované v habilitační práci jsem rozdělil do tří tematických okruhů. V prvním jsou shromážděny modifikace průtokové injekční analýzy s využitím elektroanalytických metod. Druhý okruh je věnován uplatnění elektroanalytických metod při predikci metabolismu farmak v živém organismu. Konečně okruh třetí zahrnuje příspěvky k využití elektroanalytických dat v kvantitativních vztazích mezi strukturou a vlastnostmi sloučenin.

Habilitační práce vychází z mých odborných znalostí a z výsledků mé výzkumné práce prováděné na Katedře analytické chemie PřF UK, ale i získaných v rámci spolupráce s Farmaceutickou fakultou UK v Hradci Králové, a dále mezinárodní spolupráce s Farmaceutickou fakultou Université de la Méditerranée v Marseille, Farmaceutickou fakultou Univerzity v Ankaře a milánským Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri.

Rád bych na tomto místě poděkoval všem, kteří jakkoliv přispěli a přispívají k tomu, že mohu vykonávat práci která mě těší, kteří byli a jsou mými spolupracovníky či studenty. Zvláštní poděkování pak patří mojí rodině.

Praha, 2. února 2017

**Literatura**

- [1] Štulík K.: Where are you going, electroanalysis? In: *Sensing in Electroanalysis. Vol. 5.* K. Vytřas, K. Kalcher, I. Švancara (Eds.). Pardubice, University Press Centre 2010, p. 7–11.
- [2] Ozkan S.A., Uslu B.: From mercury to nanosensors. Past, present and the future perspective of electrochemistry in pharmaceutical and biomedical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **130** (2016), 126–140.
- [3] Gupta V.K., Jain R., Radhapyari K., Jadon N., Agarwal S.: Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals. A review. *Analytical Biochemistry* **408** (2011), 179–196.
- [4] Almeida M.O., Maltarollo V.G., de Toledo R.A., Shim H., Santos M.C., Honorio K.M.: Medicinal electrochemistry. Integration of electrochemistry, medicinal chemistry and computational chemistry. *Current Medicinal Chemistry* **21** (2014), 2266–2275.
- [5] Ibanez E., Cifuentes A.: New analytical techniques in food science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **41** (2001), 413–450.
- [6] Ahmed M.U., Hossain M.M., Tamiya E.: Electrochemical biosensors for medical and food applications. *Electroanalysis* **20** (2008), 616–626.
- [7] Hanrahan G., Patil D.G., Wang J.: Electrochemical sensors for environmental monitoring. Design, development and applications. *Journal of Environmental Monitoring* **6** (2004), 657–664.
- [8] Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B., Zima J.: Nontraditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds. *Electroanalysis* **19** (2007), 2003–2014.
- [9] Rajski S.R., Williams R.M.: DNA cross-linking agents as antitumor drugs. *Chemical Reviews* **98** (1998), 2723–2795.
- [10] Rebecca A. Alderden R.A., Hall M.D., Hambley T.W.: The discovery and development of cisplatin. *Journal of Chemical Education* **83** (2006), 728–734.

## 2 Elektroanalytické metody v průtokové injekční analýze farmak

### 2.1 Průtoková injekční analýza

Cílem analytického měření je získání dostatečných informací o analytech v co nejkratším čase a s co nejmenšími náklady, z čehož plyne, že při provádění analýz jsou limitujícími faktory jednotlivé operace se vzorkem. Hlavní cestou ke zrychlení analýzy je proto automatizace jednotlivých kroků nakládání se vzorkem.

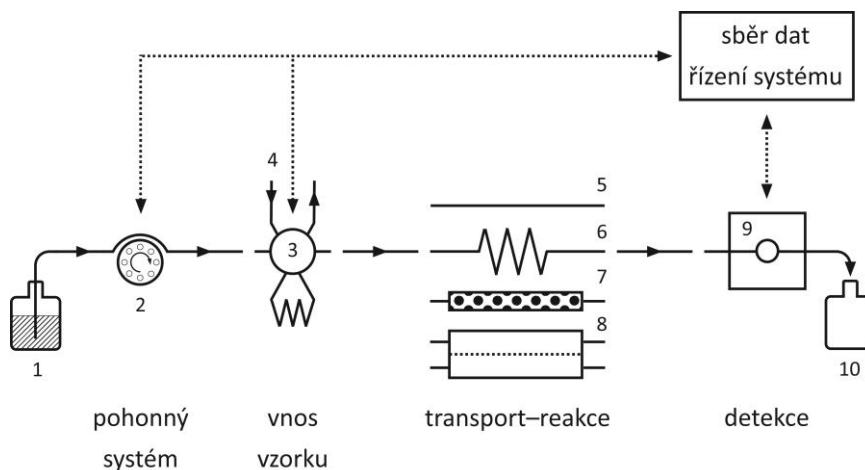
Jedním z možných přístupů k automatizaci analýz je průtoková injekční analýza (angl. flow injection analysis, FIA), navržená roku 1975 Jaromírem Růžičkou\* a Elo Haraldem Hansenem [1, 2]. Základním principem metody je nástřik malého objemu (zhruba 20–200  $\mu\text{l}$ ) roztoku vzorku do proudu nosné kapaliny. Sama nosná kapalina, která může (ale nemusí) obsahovat reakční činidlo, následně unáší vzorek systémem, kde případně analyt podléhá chemickým reakcím či fyzikálně-chemickým procesům, směrem k detektoru. To umožňuje automatizaci procesů úpravy vzorku od nástřiku k detekci analytu, což vede k vyšší rychlosti analýzy (vyšší počet vzorků za hodinu) než u neprůtokových (dávkových) metod, a rovněž i k větší reprodukovatelnosti měření. Vhodnou úpravou systému lze rovněž dosáhnout současné detekce více analytů (multikomponentní analýza).

Obecné uspořádání FIA systému (obr. 2.1) zahrnuje pět hlavních částí [3, 4]:

1. *Pohonný systém* zajišťující konstantní, nepulzující tok jedné nebo více kapalin (nosná kapalina, reakční činidla) aparaturou. Nejčastějším zařízením plnícím tuto funkci je peristaltická pumpa.

---

\* Jen pro historickou zajímavost: Prof. Růžička je absolventem naší katedry analytické chemie, kde roku 1957 obhájil diplomovou práci *Polarografie v ledové kyselině octové*.



**Obr. 2.1** Blokové schéma aparatury pro průtokovou injekční analýzu: (1) nosná kapalina/reakční činidlo, (2) peristaltická pumpa, (3) dávkovací ventil, (4) vstup vzorku, (5) transport rovnou trubičkou, (6) reakční cívka, (7) kolona se stacionární fází / reaktor s imobilizovaným reaktantem, (8) separátor fází, (9) průtokový detektor, (10) odpad (upraveno podle [4]).

2. *Systém pro vnos vzorku* do FIA aparatury, který umožňuje reprodukovatelné dávkování přesného objemu vzorku do toku kapaliny; nejčastěji je realizován jako nízkotlaký šesticestný dávkovací ventil.
3. *Transportně-reakční systém*, nazývaný (nevhodně) reaktor. Úkolem této části FIA aparatury může být:
  - a) zajistit promísení vzorku s reakčním činidlem a vhodnou dobu pro tuto reakci, obvykle pomocí reakční cívky neboli svinuté trubičky kolem pevného středu, která prodlouží dobu od vnosu vzorku k detektoru,
  - b) provést chemickou změnu vzorku pomocí chemicky aktivního materiálu (ionex, redoxní činidlo, sorbent, imobilizovaný enzym) tvořícího stacionární fází v proudu kapaliny;
  - c) zajistit fyzikálně-chemickou interakci vzorku, například separaci fází (plyn-kapalina), extrakci (kapalina-kapalina), realizovanou vřazením vhodného zařízení do systému.
4. *Detekční systém* umožňující sběr odezvy FIA systému na koncentraci analytu ve vzorku. Přednost je z pochopitelných důvodů dávana nedestruktivním detektorům s průtokovou celou (UV/VIS spektrofotometrie, spektrofluorimetrie, potenciometrie,



amperometrie), ale je možné využít i detektorů destruktivních (atomová absorpční spektrometrie, hmotnostní spektrometrie).

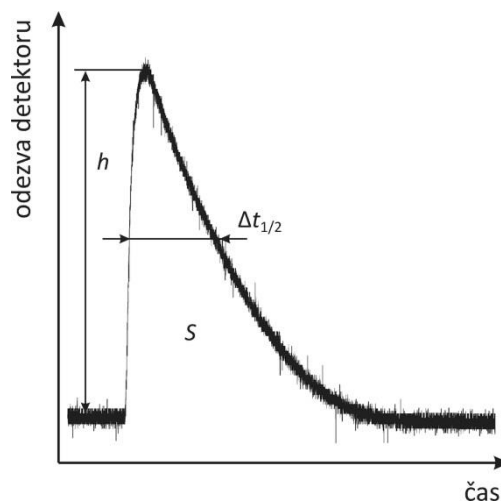
5. *Počítač* k převodu dat z detektoru a řízení aparatury.

Tyto základní části FIA aparatury mohou být dále modifikovány podle aktuálních požadavků. Rovněž tok nosného proudu může být různě upravován, programovatelně zastavován (tzv. stop-flow stanovení), zrychlován, či použit obrácený tok.

Obecně jsou pro zapojení FIA aparatury používány dva možné módy. Jednakanálový, při němž je používána pro úpravu analytu reakce pouze s jedním činidlem, které je součástí nosného proudu, nebo má nosná kapalina pouze zprostředkovat dopravu analytu k selektivnímu detektoru (AAS, spektrometrickému, elektrochemickému). Častější je vícekanálový mód, v němž před vlastní detekcí dochází k úpravě složení vzorku reakcí s několika reagenty.

V praxi jsou FIA aparatury realizovány buď prostřednictvím laboratorně sestaveného zařízení, nebo jsou i komerčně dostupné (například [5]).

Výsledkem FIA měření je časová odezva detektoru na procházející zónu vzorku, podobná jiným průtokovým technikám, nazývaná fiagram (obr. 2.2). Typický průběh fiagramu obsahuje (v okamžiku vstupu zóny vzorku do detektoru) poměrně prudký nárůst signálu, který se po dosažení maxima pozvolně snižuje (obvykle se nejedná o Gaussovský pík, jako v chromatografii). Příčinou tohoto průběhu je disperze zóny vzorku, která je závislá na průtokové rychlosti a dalších parametrech konkrétní aparatury, ale při jejich udržování na konstantních hodnotách je kontrolovatelná. Jako analytický signál je nejčastěji vyhodnocována výška píku, ale může jím být i jeho šířka v polovině výšky, jeho plocha, případně i jiné změny. Ke zvýšení signálu se v některých případech používá technika zastaveného toku (stopped-flow method), kdy je při vstupu zóny vzorku do detektoru tok zastaven a tak zvýšen signál detektoru.



**Obr. 2.2** Odezva signál-čas ve FIA měření (fiagram) a možné způsoby odečtu analytického signálu ( $h$  – výška píku,  $\Delta t_{1/2}$  – šířka píku v polovině jeho výšky,  $S$  – plocha píku).

Oproti ostatním analytickým technikám se FIA liší zejména tím, že reakční čas je obvykle velmi krátký, takže ani nemusí dojít k ustavení chemické rovnováhy – nicméně v tom případě je reprodukovatelně dosaženo stupně přeměny analytu. To, zároveň s disperzí zóny vzorku v nosném proudu, vede ke snížení intenzity signálu analytu. Oba tyto faktory vedou obecně k nižší citlivosti FIA (a vyšším hodnotám limitu stanovitelnosti), která je na druhé straně dostatečně vyrovnána univerzálností systému, jehož vhodnou modifikací může být citlivost stanovení zvýšena, ale zejména již zmíněnou vyšší rychlostí analýzy. Z praktického hlediska je nezanedbatelnou výhodou i uzavřenost celého systému, takže reagentie a vzorek nepřichází do styku s okolní atmosférou.

Hlubší základy teorie FIA jsou popsány v mnoha monografiích, z nichž lze uvést klasickou J. Růžičky a E.H. Hansena [6] nebo nejnovější V. Cerdy a kol. [7]; nebude jim zde proto věnováno dále místo. Přirozeně existují tisíce aplikačních prací na stanovení nejrůznějších látek, jejich počet se odhaduje na více než 20 000 publikací [8, 9].

Při vývoji nové FIA metody je klíčovým výběr vhodné chemické či fyzikálně-chemické interakce pro konverzi analytu na detekovatelnou formu, od čehož se odvíjí složení nosného proudu, reagentií a zejména typ a konkrétní uspořádání transportně-reakčního systému (včetně detekce). Právě v tom tkví úspěšnost FIA, protože možných kombinací je prakticky nekonečně [9]. Možnost automatizovat potřebné operace se vzorkem je velmi atraktivní při vývoji nových přístrojů pro analytickou praxi a pro rutinní použití; to lze demonstrovat na popularitě této metody v analytických normách ČSN a/nebo ISO. Významnou cestou i do budoucnosti je miniaturizace FIA analýzy (lab-on-chip) snižující

náklady na stanovení i jeho ekologickou zátěž [10, 11], spojování s jinými analytickými technikami, zejména s HPLC [12, 13], kapilární zónovou elektroforézou [14] nebo atomovou absorpční spektrometrií [15], využití nanočástic [16] a aplikace pro multi-komponentní stanovení [17, 18].

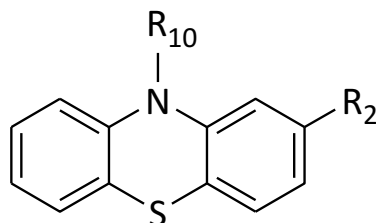
## 2.2 FIA stanovení fenothiazinů

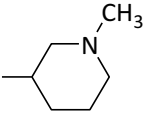
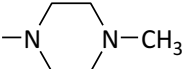
Jednou z oblastí, v níž je FIA hojně využívána je farmaceutická analýza [19]. V této oblasti jsme vyvinuli dvě modifikace FIA pro stanovení farmak ze skupiny fenothiazinů, popsané níže.

Fenothiaziny [20] jsou tricyklické heterocykly s atomem síry v poloze 5 a atomem dusíku v poloze 10, obvykle substituované v poloze 2 a 10. Chemická struktura fenothiazinu a jeho nejběžnějších derivátů je uvedena v tab. 2.1. První látka tohoto typu, methylenová modř, byla syntetizována roku 1876 německým chemikem Heinrichem Caro (1834–1910; cit. [21]). Její struktura byla objasněna až roku 1885 rovněž německým chemikem Henrichem Augustem Bernthsenem (1855–1931). Na konci 19. století objevil Paul Ehrlich aktivitu methylenové modři proti plasmodiím. Následovaly syntézy dalších derivátů a objevy jiných farmakologicky významných vlastností fenothiazinů. Obecně platí, že substituce do polohy 10 vede k antihistaminikům a antiparkinsonikům, deriváty substituované v poloze 2 a 10 jsou neuroleptiky [22, 23]. Neméně zajímavě se deriváty fenothiazinu uplatňují v analytické chemii jako činidla či indikátory [24, 25].

**Tabulka 2.1**

Chemická struktura fenothiazinu a jeho nejběžnějších derivátů



derivát	R <sub>2</sub>	R <sub>10</sub>
diethazin	-H	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
chlorpromazin	-Cl	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
levomepromazin	-OCH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
promethazin	-H	-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
thioridazin	-SCH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> - 
trifluoperazin	-CF <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> - 

Pro stanovení fenothiazinů jak v léčivých přípravcích, tak v tělních tekutinách byla vypracována řada metod, od chemických stanovení až k stanovením instrumentálním, uvádí je přehledové články [26, 27, 28]. Publikovaná stanovení fenothiazinů pomocí FIA jsou shrnuta v tab. 2.2, obsahující celkem 52 publikací (vynechány jsou naše dvě publikace podrobněji popsání níže), ze které je patrné, že principem většiny metod je využití redoxních vlastností fenothiazinového jádra.

Na okraj lze uvést, že fenothiaziny mohou být naopak uplatněny i jako činidla či modifikátory ve FIA stanoveních NADH [29], hemoglobinu [30], ethanolu [31], glutamové kyseliny [32], cysteinu [33], peroxidu vodíku [34], bromičnanů [35], sulfidů [36, 37], a řady dalších anorganických aniontů [38].

**Tabulka 2.2**

Publikované principy FIA stanovení fenothiazinů v různých matricích a jejich limity kvantifikace. Analyzované fenothiaziny: **1** Azur A, **2** diethazin, **3** ethopropazin, **4** flufenazin, **5** chlorpromazin, **6** levomepromazin, **7** methylenová modř, **8** perazin, **9** perfenazin, **10** prochlorperazin, **11** promazin, **12** promethazin, **13** thionin, **14** thioproperazin, **15** thioridazin, **16** trifluoperazin, **17** trimeprazin.

detekce / princip stanovení	matrice	analyzované fenothiaziny	LOQ [mg/l]	ref.
<b>Elektrochemická detekce</b>				
<b>1. amperometrie</b>				
▪ na zlaté elektrodě se SAM thiocholesterolu	moč	<b>11</b>	–	[39]
▪ na elektrodě s imobilizovanou peroxidasou	léčivé přípravky	<b>5, 11, 12, 15, 16</b>	0,01	[40]
▪ na elektrodě ze skelného uhlíku	–	–	–	[41]
▪ na uhlíkovém vlákne	léčivé přípravky	<b>4, 9, 16</b>	–	[42]
<b>2. biamperometrie nepřímá</b>	léčivé přípravky	<b>11, 15</b>	0,4	[43]
<b>3. voltametrie</b>				
▪ s korekcí proudu pozadí	–	<b>5</b>	–	[44]
▪ diferenční pulzní voltametrie	–	<b>5</b>	–	[45]
▪ square-wave s Fourierovou transformací na mikroelektrodě	–	<b>2, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 17</b>	0,01	[46]
<b>Spektrometrická detekce</b>				
<b>1. fluorescence</b>				
▪ na biosenzoru s imobilizovaným kalmodulinem	moč	<b>16</b>	0,52	[47]
▪ indukovaná fotochemicky	léčivé přípravky, moč	<b>3, 6, 14, 16</b>	0,060–0,400	[48]
	moč	<b>1, 7, 13</b>	0,013–0,035	[49]
	léčivé přípravky	<b>5, 12</b>	–	[50]
	–	<b>5, 12</b>	–	[51, 52]
▪ indukovaná fotochemicky, stopped-flow mód	léčivé přípravky	<b>5, 9, 12</b>	0,050	[53, 54]
▪ po oxidaci fenothiazinu Ce <sup>4+</sup>	léčivé přípravky	<b>12</b>	–	[55]
	léčivé přípravky	<b>16, 17</b>	–	[56]

Tabulka 2.2 pokračuje na další straně.

Pokračování tabulky 2.2 z předchozí strany.

detekce / princip stanovení	matrice	analyzované fenothiaziny	LOQ [mg/l]	ref.
▪ po oxidaci fenothiazinu $\text{KMnO}_4$	léčivé přípravky, moč	<b>5, 9, 12</b>	0,01	[57]
▪ po oxidaci fenothiazinu $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	–	<b>15</b>	–	[58]
<b>2. chemiluminiscence</b>				
▪ elektrooxidací fenothiazinu	–	<b>5</b>	0,04	[59]
▪ oxidací fenothiazinu $\text{Ce}^{4+}$	léčivé přípravky	<b>5, 9, 12</b>	0,007	[60]
	léčivé přípravky	<b>4, 5, 9, 15, 16</b>	0,003	[61]
▪ oxidací fenothiazinu $\text{Ce}^{4+}$ a reakcí s $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$	léčivé přípravky, sérum	<b>4, 5</b>	0,030	[62]
▪ oxidací fenothiazinu $\text{Ce}^{4+}$ reakci s rhodaminem B	léčivé přípravky, plasma a moč	<b>4, 6, 17</b>	0,33	[63]
▪ oxidací fenothiazinu $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ a reakcí s luminolem	léčivé přípravky	<b>5, 16, 17</b>	–	[64]
▪ oxidací fenothiazinu $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a reakcí s luminolem	léčivé přípravky	<b>5, 11</b>	0,016	[65]
▪ oxidací fenothiazinu $\text{KMnO}_4$	léčivé přípravky	<b>15</b>	1,5	[66]
	léčivé přípravky	<b>12</b>	0,005	[67]
▪ oxidací fenothiazinu $\text{KMnO}_4$ a reakcí s luminolem	léčivé přípravky, moč	<b>4, 5, 9, 15</b>	0,007	[68]
<b>3. kinetické stanovení s askorbovou kyselinou</b>	léčivé přípravky	<b>1, 7, 13</b>	0,15	[69]
<b>4. turbidimetrie po reakci s bromfenolovou modří</b>	léčivé přípravky	<b>12</b>	25	[70]
<b>5. VIS spektrofotometrie</b>				
▪ extrakce iontového asociátu fenothiazinu s chromazurolem S	léčivé přípravky	<b>2, 4, 5</b>	0,14	[71]
▪ nepřímá, měřením množství $\text{Fe}^{2+}$ (absorbance komplexu $\text{Fe}^{2+}$ – ferrozín) vznikajícího oxidací fenothiazinu $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$	léčivé přípravky	<b>12, 16</b>	0,3–0,5	[72]

Tabulka 2.2 pokračuje na další straně.

*Pokračování tabulky 2.2 z předchozí strany.*

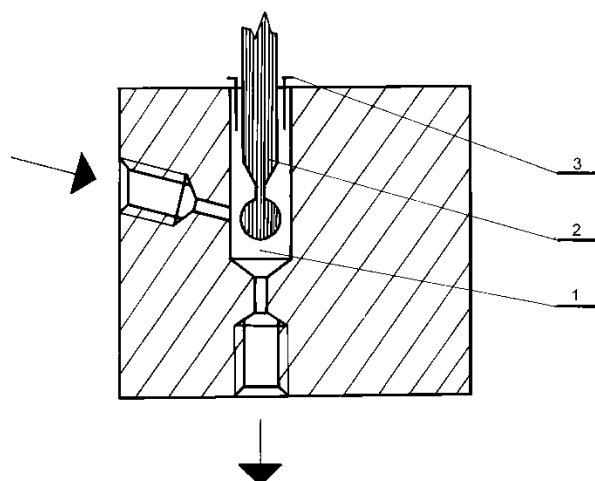
detekce / princip stanovení	matrice	analyzované fenothiaziny	LOQ [mg/l]	ref.
▪ po oxidaci fenothiazinu $Ce^{4+}$	léčivé přípravky	<b>12</b>	–	[73, 74]
	léčivé přípravky	<b>5</b>	–	[75]
	léčivé přípravky	<b>17</b>	–	[76]
▪ po oxidaci fenothiazinu $CeAsO_3$ imobilizovaným na tuhé fázi	léčivé přípravky	<b>12</b>	5	[77]
	léčivé přípravky	<b>4</b>	0,05	[78]
▪ po oxidaci fenothiazinu $FeCl_3$	–	<b>11, 15</b>	10	[79]
▪ po oxidaci fenothiazinu $Fe(ClO_4)_3$	léčivé přípravky	<b>4, 5, 6, 11, 12, 14, 15, 16</b>	0,6–1,6	[80]
▪ po oxidaci fenothiazinu $H_3PW_{12}O_{40}$	léčivé přípravky	<b>15</b>	10	[81]
▪ po oxidaci fenothiazinu $HPMoO_2$	léčivé přípravky	<b>11</b>	1	[82]
▪ po oxidaci fenothiazinu $IO_3^-$ nebo $Fe^{3+}$	–	<b>4, 5, 12</b>	0,05–0,2	[83]
▪ po oxidaci fenothiazinu $K_2Cr_2O_7$	léčivé přípravky	<b>5, 12, 17</b>	–	[84]
	–	<b>11, 15</b>	10	[85]
▪ po oxidaci fenothiazinu $K_3[Fe(CN)_6]$	léčivé přípravky	<b>11</b>	–	[86]
	moč	<b>4, 5, 6, 12, 15</b>	–	[87]
▪ po oxidaci fenothiazinu $MnO_2$ imobilizovaným na tuhé fázi	léčivé přípravky	<b>5, 11, 12, 15, 16</b>	0,6–1,1	[88,89]
▪ po oxidaci fenothiazinu $NH_4VO_3$	léčivé přípravky	<b>5, 9, 12, 17</b>	–	[90]
	léčivé přípravky	<b>4, 12</b>	–	[91]

### 2.2.1 *FIA titrační stanovení fenothiazinů ve vodném micelárním a nevodném prostředí*

První studie, v níž jsme se zabývali FIA fenothiazinů [92 ► příloha A], vzešla z poznatku, že hodnota disociační konstanty fenothiazinů může být v přítomnosti kationaktivních tenzidů posunuta k nižším hodnotám ( $pK_a \approx 7$ ), takže mohou být stanoveny alkalimetricky. Nosný proud proto obsahoval kromě titračního činidla ( $5 \times 10^{-5}$  mol  $dm^{-3}$  hydroxid sodný) i tenzid Septonex ( $3 \times 10^{-3}$  mol  $dm^{-3}$ ). Průběh titrace jsme sledovali

potenciometricky pomocí pH elektrody v průtokové cele nebo spektrofotmetricky po přidavku thymolové modři. Abychom dosáhli zvýšení rychlosti dávkování vzorku, studovali jsme jak použití mísící komůrky před detektorem, tak tzv. high-speed mód, v němž se dosahuje pouze částečné konverze analytu.

V druhé části téže studie jsme do FIA uspořádání převedli klasickou nevodnou titrací fenothiazinů kyselinou chloristou v prostředí bezvodé octové kyseliny (jedná se o první FIA tohoto typu, s výjimkou práce [93], kde je sice rovněž titrováno kyselinou chloristou v bezvodé octové kyselině, ovšem se spektrofotometrickou detekcí). Jako indikační technika sloužila potenciometrie s pH mikroelektrodou v průtokové cele vlastní konstrukce (obr. 2.3), jako signál byl použit potenciál elektrody. V obecném uspořádání FIA systému, diskutovaném v kap. 2.1 se tedy jedná o úpravu detekčního systému.



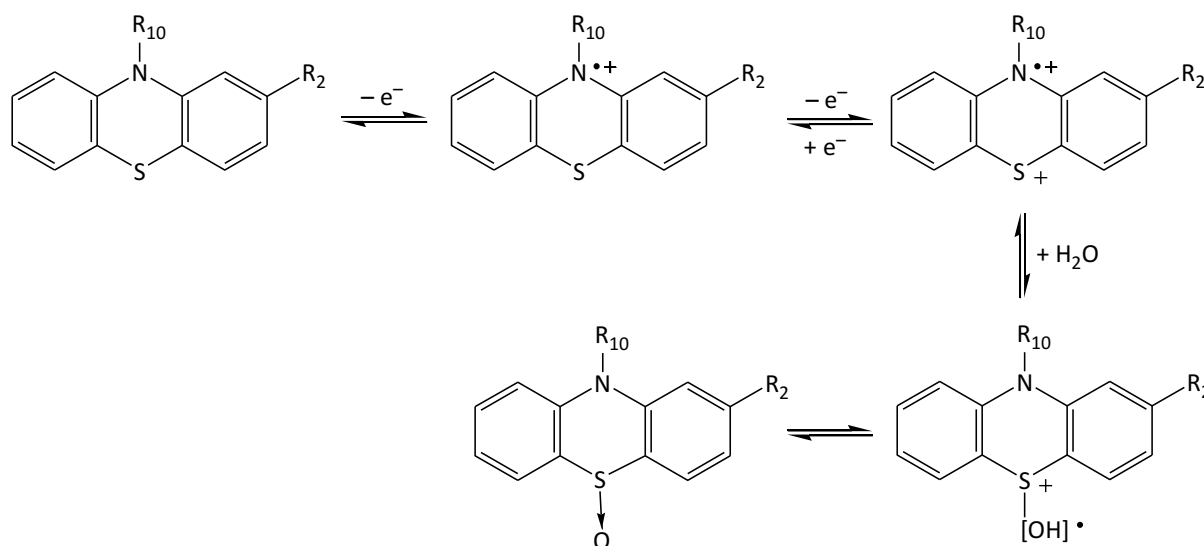
**Obr. 2.3** Schéma detekční cely pro high-speed FIA titraci v nevodném prostředí: (1) průtoková celi, (2) pH-mikroelektroda, (3) těsnění.

Obě vyvinuté metody byly aplikovány na léčivé přípravky (potahované tablety) diethazinu a chlorpromazinu, při čemž bylo zjištěno, že při titraci ve vodném micelárním prostředí interferují pomocné látky z tablet. Naproti tomu výsledky FIA stanovení v nevodném prostředí byly plně srovnatelné s lékopisným stanovením, oproti němuž mají značně nižší časovou náročnost (metoda umožňuje analýzu až čtyřiceti vzorků za hodinu) a odpadají problémy spojené s prací v silně korozivním prostředí bezvodé octové kyseliny.



### 2.2.2 FIA spektrofluorimetrické stanovení fenothiazinů po jejich fotochemické, chemické nebo elektrochemické oxidaci

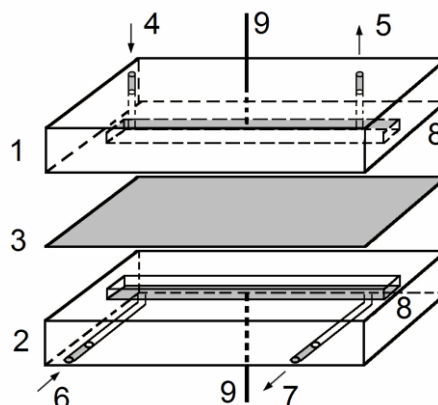
Naším druhým příspěvkem k FIA stanovení fenothiazinů [94 ► příloha B] bylo studium možnosti využití tvorby radikálů fenothiazinů s jejich následnou spektrofluorimetrickou detekcí, která umožňuje velmi citlivou detekci s nízkými limity stanovení, což je jedním z trendů současného rozvoje FIA [9]. Oxidace fenothiazinů je velmi častým principem stanovení těchto látek (jak je ostatně patrné z tab. 2.2). V literatuře jsou podrobně popsány reakční mechanismy elektrooxidace [95] a fotochemické oxidace [96], na základě kterých bylo navrženo obecné schéma oxidace fenothiazinů, znázorněné na obr. 2.4.



**Obr. 2.4** Obecný mechanismus oxidace derivátů fenothiazinu (upraveno podle [97]).

Vznikající radikál je v silně kyselém prostředí stabilní a poskytuje fluorescenční odezvu. V naší práci jsme ke generaci tohoto radikálu využili tři metody: fotooxidaci UV zářením, chemickou oxidací manganistanem draselným nebo síranem ceričitým a konečně elektrochemickou oxidací v průtokové cele. Průtoková cela byla vlastní konstrukce (obr. 2.5); v obecném uspořádání FIA systému, diskutovaném v kap. 2.1 se tedy jedná o úpravu transportně-reakčního systému.

**Obr. 2.5** Schéma elektrochemické cely pro oxidaci fenothiazinů ve FIA stanovení: (1) anodový prostor, (2) katodový prostor, (3) iontově výměnná membrána, (4) vstup nosného proudu se vzorkem, (5) výstup nosného proudu se zoxidovaným vzorkem ke spektrofotometru, (6) katolyt (kyselina sírová), (7) odpad, (8) platinový plíšek, (9) měděný kontakt.



Ze všech tří studovaných metod se jako nejcitlivější a s nejnižším limitem kvantifikace ukázala fotooxidace, u níž bylo dosaženo  $LOQ = 0,087$  mg/l (dosud nejnižší limit kvantifikace dosažený při tomto způsobu konverze analytu [98]). Naopak elektrochemický způsob generování radikálů fenothiazinů vykazoval nejmenší citlivost a zhruba třikrát vyšší limit kvantifikace ( $LOQ = 0,27$  mg/l), nicméně při tomto způsobu byl největší lineární dynamický rozsah koncentrací analytu a uspořádání je experimentálně nejjednodušší. Rovněž časová náročnost elektrochemického způsobu generování radikálů fenothiazinů je menší (šedesát vzorků za hodinu) než u způsobu s fotooxidací (třicet vzorků za hodinu). Dosažené výsledky stanovení obsahu účinných látek v léčivých přípravcích (potahované tablety) byly shodné s výsledky získanými lékopisnou metodou (UV spektrofotometrie).

## Literatura

- [1] Růžička J., Hansen E.H.: Flow injection analyses. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta* **78** (1975), 145–157.
- [2] Hansen E.H.: Flow injection analysis: its origins and progress. In: *Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry. Volume 58. Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*. S.D. Kolev, I.D. McKelvie (eds.). Elsevier 2008, p. 3–21.
- [3] McKelvie I.D.: Principles of flow injection analysis. In: *Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry. Volume 58. Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*. S.D. Kolev, I.D. McKelvie (eds.). Elsevier 2008, p. 81–109.
- [4] Luque de Castro M.D.: Flow injection analysis. Theory and instrumentation. In: *Encyclopedia of Analytical Science. Volume 3*. A. Townshend (ed.). London, Academic Press 1995, p. 1299–1314.

- [5] <http://www.flowinjection.com/>
- [6] Ružička J., Hansen E.H.: *Flow Injection Analysis*. 2nd Edition. New York, Wiley-Interscience 1988.
- [7] Cerdà V., Ferrer L., Avivar J., Cerdà A.: *Flow Analysis: A Practical Guide*. Amsterdam, Elsevier 2014.
- [8] Chalk S.: Bibliometrics. In: *Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry. Volume 58. Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*. S.D. Kolev, I.D. McKelvie (eds.). Elsevier 2008, p. 111–125.
- [9] Trojanowicz M., Kołacińska K.: Recent advances in flow injection analysis. *Analyst* **141** (2016), 2085–2139.
- [10] Prieto-Simón B., Campàs M., Andreescu S., Marty J.L.: Trends in flow-based biosensing systems for pesticide assessment. *Sensors* **6** (2006), 1161–1186.
- [11] Melchert W.R., Reis B.F., Rocha F.R.P.: Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. *Analytica Chimica Acta* **714** (2012), 8–19.
- [12] Clavijo S., Avivar J., Suárez R., Cerdà V.: Analytical strategies for coupling separation and flow-injection techniques. *Trends in Analytical Chemistry* **67** (2015), 26–33.
- [13] Ali I., Gupta V.K., Aboul-Enein H.Y., Hussain A.: Hyphenation in sample preparation. Advancement from the micro to the nano world. *Journal of Separation Science* **31** (2008), 2040–2053.
- [14] Kubáň P., Karlberg B.: Flow/sequential injection sample treatment coupled to capillary electrophoresis. A review. *Analytica Chimica Acta* **648** (2009), 129–145.
- [15] Wang J., Hansen E.H.: Trends and perspectives of flow injection/sequential injection on-line sample-pretreatment schemes coupled to ETAAS. *Trends in Analytical Chemistry* **24** (2005), 1–8.
- [16] Passos M.L.C., Pinto P.C.A.G., Santos J.L.M., Saraiva M.L.M.F.S., Araujo A.R.T.S.: Nanoparticle-based assays in automated flow systems. A review. *Analytica Chimica Acta* **889** (2015), 22–34.
- [17] Hlabangana L., Hernández-Cassou S., Saurina, J.: Multicomponent determination of drug using flow-injection analysis. *Current Pharmaceutical Analysis* **2** (2006), 127–140.
- [18] Saurina, J.: Flow-injection analysis for multi-component determinations of drugs based on chemometric approaches. *Trends in Analytical Chemistry* **29** (2010), 1027–1037.
- [19] Calatayud J.M.: *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals. Automation in the Laboratory*. Taylor & Francis 2003.
- [20] Taurand G.: Phenothiazine and derivatives. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 7th Edition. Wiley 2000.
- [21] Ohlow M.J., Moosmann B.: Phenothiazine: the seven lives of pharmacology's first lead structure. *Drug Discovery Today* **16** (2011), 119–131.
- [22] Mosnaim A.D., Ranade V.V., Wolf M.E., Puente J., Valenzuela M.A.: Phenothiazine molecule provides the basic chemical structure for various classes of pharmacotherapeutic agents. *American Journal of Therapeutics* **13** (2006), 261–273.
- [23] Jaszczyszyn A., Gasiorowski K., Swiatek P., Malinka W., Cieslik-Boczula K., Petrus J., Czarnik-Matusiewicz B.: Chemical structure of phenothiazines and their biological activity. *Pharmacological Reports* **64** (2012), 16–23.

- [24] Puzanowska-Tarasiewicz H., Karpińska J., Kojło A., Starczewska B., Wołyniec E.: The reactions of 2,10-disubstituted phenothiazines with metal ions. A review. *Chemia Analytyczna* **48** (2003), 181–187.
- [25] Karpinska J., Starczewska B., Puzanowska-Tarasiewicz H.: Analytical properties of 2- and 10-disubstituted phenothiazine derivatives. *Analytical Sciences* **12** (1996), 161–170.
- [26] Madej K., Koscielniak P.: Review of analytical methods for identification and determination of PHEs and tricyclic antidepressants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **38** (2008), 50–66.
- [27] Hefnawy M.M.: Analysis of certain tranquilizers in biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **27** (2002), 661–678.
- [28] Kojło A., Karpinska J., Kuzmicka L., Misiuk W., Puzanowska-Tarasiewicz H., Tarasiewicz M.: Analytical study of the reaction of phenothiazines with some oxidants, metal ions, and organic substances. *Journal of Trace and Microprobe Techniques* **19** (2001), 45–70.
- [29] Gao Q., Wang W., Ma Y., Yang X.: Electrooxidative polymerization of phenothiazine derivatives on screen-printed carbon electrode and its application to determine NADH in flow injection analysis system. *Talanta* **62** (2004), 477–482.
- [30] Zhou J., Wang E.: Flow injection analysis for myoglobin and hemoglobin at toluidine blue chemically modified electrode. *Electroanalysis* **3** (1991), 203–207.
- [31] Dominguez E., Lan H.L., Okamoto Y., Hale P.D., Skotheim T.A., Gorton L., Hahn-Haegerdal B.: Reagentless chemically modified carbon paste electrode based on a phenothiazine polymer derivative and yeast alcohol dehydrogenase for the analysis of ethanol. *Biosensors & Bioelectronics* **8** (1993), 229–237.
- [32] Gomes S.P., Dolezalova J., Araujo A.N., Couto C.M.C.M., Montenegro M.C.B.S.M.: Glutamate sol-gel amperometric biosensor based on co-immobilised NADP<sup>+</sup> and glutamate dehydrogenase. *Journal of Analytical Chemistry* **68** (2013), 794–800
- [33] Shanmugam R., Barathi P., Zen J.M., Kumar A.S.: An unusual electrochemical oxidation of phenothiazine dye to phenothiazine-bi-1,4-quinone derivative (a donor-acceptor type molecular hybrid) on MWCNT surface and its cysteine electrocatalytic oxidation function. *Electrochimica Acta* **187** (2016), 34–45.
- [34] Rajendran V., Csoregi E., Okamoto Y., Gorton L.: Amperometric peroxide sensor based on horseradish peroxidase and toluidine blue O-acrylamide polymer in carbon paste. *Analytica Chimica Acta* **373** (1998), 241–251.
- [35] Oliveira S.M., Segundo M.A., Rangel A.O.S.S., Lima J.L.F.C., Cerda V.: Spectrophotometric determination of bromate in water using multisyringe flow injection analysis. *Analytical Letters* **44** (2011), 284–297.
- [36] Santos J.C.C., Santos E.B.G.N., Korn M.: A comparison of flow injection methods for sulfide determination based on phenothiazine dyes produced from diverse aromatic amines. *Microchemical Journal* **90** (2008), 1–7.

- [37] Chen P.Y., Chi Y.M., Yang H.H. Shih Y.: A sulfite sensor based on electrocatalytic oxidation at a phenothiazine drop-coated screen-printed carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **675** (2012), 1–4.
- [38] Mueller H., Hansen E.H.: High-speed flow injection determinations of oxidative agents in aqueous solutions based on reaction with on-line generated Leuko-dye. *Chemische Technik* **42** (1990), 304–307.
- [39] Yang Z., Kauffmann J.M., Acedo Valenzuela M.I., Ozkan S.: Electroanalytical behavior of a nanoarray self-assembled thiocholesterol gold electrode. *Mikrochimica Acta* **131** (1999), 85–90.
- [40] Petit Ch., Murakami K., Erdem A., Kilinc E., Ortiz Borondo G., Liegeois J.F., Kauffmann J.M.: Horse-radish peroxidase immobilized electrode for phenothiazine analysis. *Electroanalysis* **10** (1998), 1241–1248.
- [41] Lazaris A.Y., Beloded L.N., Kalinin A.I.: Amperometric flow-through solid electrode detector design: performance and application in high-performance liquid chromatography for the micro-determination of antioxidants in monomers. *Journal of Chromatography* **365** (1986), 333–342.
- [42] Belal F., Anderson J.L.: Flow injection analysis of three *N*-substituted phenothiazine drugs with amperometric detection at a carbon fiber array electrode. *Analyst* **110** (1985), 1493–1496.
- [43] Michalowski J., Kojlo A., Magnuszewska B., Trojanowicz M.: Flow-injection biamperometry of phenothiazine derivatives. *Analytica Chimica Acta* **289** (1994), 339–346.
- [44] Wang J., Dewald H.D.: Background-current subtraction in voltammetric detection for flow-injection analysis. *Talanta* **31** (1984), 387–390.
- [45] Wang J., Dewald H.D.: Potential scanning voltammetric detection for flow injection systems. *Analytica Chimica Acta* **153** (1983), 325–330.
- [46] Magnuszewska J., Krogulec T., Baranski A.S.: Fast Fourier transform square-wave voltammetry detection of phenothiazines in capillary electrophoresis. *Chemia Analityczna* **45** (2000), 189–203.
- [47] Gonzalez-Andrade M., Benito-Pena E., Mata R., Moreno-Bondi M.C.: Biosensor for on-line fluorescent detection of trifluoroperazine based on genetically modified calmodulin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **402** (2012), 3211–3218.
- [48] Laassis B., Aaron J.J.: Flow-injection fluorimetric analysis of several aminophenothiazines based on photooxidation. *Analisis* **25** (1997), 183–188. *Chem. Abstr.* **127**:253265.
- [49] Laassis B., Aaron J.J., Mahedero M.C.: Fluorometric determination of phenothiazine derivatives by photooxidation in a flow-injection system. *Talanta* **41** (1994), 1985–1989.
- [50] Chen D., Rios A., Luque de Castro M.D., Valcarcel M.: Simultaneous flow-injection determination of chlorpromazine and promethazine by photochemical reaction. *Talanta* **38** (1991), 1227–1233.
- [51] Martínez Calatayud J., Gómez Benito C.: Photochemical derivatization and spectrofluorimetric determination of chlorpromazine by flow injection. *Analytica Chimica Acta* **256** (1992), 105–111.
- [52] Mellado Romero A., Gomez Benito C., Martinez Catalayud J.: Photochemical derivatization and fluorimetric determination of promethazine in a FIA assembly. *Analytical Letters* **25** (1992), 1289–1308.

- [53] Gutierrez M.C., Gomez-Hens A., Perez-Bendito D.: Individual and simultaneous stopped-flow fluorimetric determination of perphenazine and chlorpromazine. *Analytical Letters* **20** (1987), 1847–1865.
- [54] Chen D., Rios A., Luque de Castro M.D., Valcarcel, M.: Photochemical-spectrofluorometric determination of phenothiazine compounds by unsegmented-flow methods. *Analyst* **116** (1991), 171–176.
- [55] Martinez Calatayud J., Sancho Garcia T.: Fluorometric determination of promethazine hydrochloride by flow-injection analysis (FIA) and oxidation by cerium(IV). *Pharmazie* **47** (1992), 557–558.
- [56] Pérez-Ruiz T., Martínez-Lozano C., Tomás V., Sidrach de Cardona C.: Flow-injection fluorimetric determination of trimeprazine and trifluoperazine in pharmaceutical preparations. *Talanta* **40** (1993), 1361–1365.
- [57] Ma H., Gao R., Luo J., Yang M.: Determination of phenothiazines drugs by flow injection on-line oxidizing fluorophotometric method. *Fenxi Ceshi Xuebao* **29** (2010), 364–367. *Chem. Abstr.* **155**:193627.
- [58] Tena M.T., Luque de Castro M.D., Valcarcel M.: Automation of photochemical kinetic determinations without irradiation of the detection cell. *Journal of Automatic Chemistry* **13** (1991), 111–113.
- [59] Wang H., Xu G., Dong S.: Electrochemiluminescence sensor using tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) immobilized in Eastman-AQ55D–silica composite thin-films. *Analytica Chimica Acta* **480** (2003), 285–290.
- [60] Han X., Tang Y., Yu Ch., Wang N., Xiong X.: Determination of phenothiazines by a flow-injection chemiluminescence method. *Yaowu Fenxi Zazhi* **25** (2005), 1527–1530. *Chem. Abstr.* **146**:468921.
- [61] Halaburda P., García Mateo J.V.: Chemiluminometric determination of phenothiazines by means of a combined multi-commutated/multi-pumped flow assembly. *Talanta* **96** (2012), 202–209.
- [62] Mokhtari A., Rezaei B.: Chemiluminescence determination of chlorpromazine and fluphenazine in pharmaceuticals and human serum using tris(1,10-phenanthroline) ruthenium(II). *Analytical Methods* **3** (2011), 996–1002.
- [63] Aly F.A., Alarfaj N.A., Alwarthan A.A.: Flow-injection chemiluminometric determination of some phenothiazines in dosage forms and biological fluids. *Analytica Chimica Acta* **358** (1998), 255–262.
- [64] Pérez-Ruiz T., Martínez-Lozano C., Sanz A., San Miguel M.T.: Flow-injection chemiluminescent determination of phenothiazines in pharmaceutical preparations. *Laboratory Automation & Information Management* **34** (1999), 149–158.
- [65] Yang J., Huang Y.: Determination of phenothiazine drugs in  $K_3[Fe(CN)_6]$ -luminol systems. *Yaowu Fenxi Zazhi* **22** (2002), 453–456. *Chem. Abstr.* **140**:65339.
- [66] Kojlo A., Michalowski J., Wolyniec E.: Chemiluminescence determination of thioridazine hydrochloride by flow-injection analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **22** (2000), 85–91.

- [67] Sultan S.M., Hassan Y.A.M., Abulkibash A.M.: Chemiluminescence assay of promethazine hydrochloride using acidic permanganate employing flow injection mode operated with syringe and peristaltic pumps. *Talanta* **59** (2003), 1073–1080.
- [68] Li Y., Niu W., Lu J.: Sensitive determination of phenothiazines in pharmaceutical preparation and biological fluid by flow injection chemiluminescence method using luminol-KMnO<sub>4</sub> system. *Talanta* **71** (2007), 1124–1129.
- [69] Perez-Ruiz T., Martinez-Lozano C., Tomas V., Sanz A.: Photokinetic determination of phenothiazine dyes by a flow-injection chemiluminescent method. *Quimica Analitica* **15** (1996), 326–333. *Chem. Abstr.* **126**:122552
- [70] Martinez Calatayud J., Navasquillo Sarrion S., Sanchez Sampedro A., Gomez Benito C.: Determination of promethazine hydrochloride with bromophenol blue by a turbidimetric method and flow injection analysis. *Microchemical Journal* **45** (1992), 129–136.
- [71] Rychlovský P., Němcová I., Mísařová H., Zaňátová M.: FIA liquid-liquid extraction spectrophotometric determination of phenothiazine derivatives in pharmaceuticals. *Laboratory Robotics and Automation* **8** (1996), 213–219.
- [72] Ruedas Rama M.J., Ruiz Medina A., Molina Díaz A.: Bead injection spectroscopy-flow injection analysis (BIS-FIA). An interesting tool applicable to pharmaceutical analysis: determination of promethazine and trifluoperazine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **35** (2004), 1027–1034.
- [73] Martinez Calatayud J., Garcia Sancho T.: Spectrophotometric determination of promethazine by flow injection analysis and oxidation by Ce<sup>IV</sup>. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **10** (1992), 37–42.
- [74] Mottola H.A., Hanna A.: Kinetic parameters relevant to repetitive determinations via transient signals in flow-through systems. Part I. Direct sample injection into the detection chamber with application to the determination of some phenothiazines by a transient redox effect. *Analytica Chimica Acta* **100** (1978), 167–180.
- [75] Suliman F.E.O., Sultan S.M. Sequential optimization of a flow injection spectrophotometric method for the assay of chlorpromazine in pharmaceutical preparations. *Talanta* **41** (1994), 1865–1871.
- [76] Sultan S.M.: Flow injection method for the assay of trimeprazine tartrate by its oxidation with cerium(IV) sulfate. *Microchemical Journal* **44** (1991), 304–310.
- [77] Martinez Calatayud J., Garcia Mateo V.: Cerium(IV) arsenite as a solid-phase reactor for use in flow-injection analysis. Spectrophotometric determination of promethazine. *Analytica Chimica Acta* **264** (1992), 283–289.
- [78] Laredo Ortiz S., Gómez Benito C., Martínez Calatayud J.: Determination of fluphenazine hydrochloride in a flow assembly incorporating cerium(IV) arsenite as a solid-bed sector. *Analytica Chimica Acta* **276** (1993), 281–286.

- [79] Karpinska J., Kojlo A., Grudniewska A., Puzanowska-Tarasiewicz H.: An improved flow injection method for the assay of phenothiazine neuroleptics in pharmaceutical preparations using Fe(III) ions. *Pharmazie* **51** (1996), 950–954.
- [80] Koupparis M. A., Barcuchová A.: Automated flow injection spectrophotometric determination of some phenothiazines using iron perchlorate: applications in drug assays, content uniformity, and dissolution studies. *Analyst* **111** (1986), 313–318.
- [81] Kojlo A., Wolyniec E., Puzanowska-Tarasiewicz H.: Application of flow injection method for the determination of thioridazine. *Analytical Letters* **30** (1997), 2733–2742.
- [82] Puzanowska-Tarasiewicz H., Wolyniec E., Kojlo A.: Flow injection spectrophotometric determination of promazine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **14** (1996), 267–271.
- [83] Ahmad A.K.S., El-Gendy A.E., Ellaithy M.M.: Flow injection analysis of pharmaceutical compounds. 1. Determination of phenothiazines and spectrophotometric detection. *Bulletin of the Faculty of Pharmacy (Cairo University)* **28** (1990), 7–10. *Chem. Abstr.* **117**:33836.
- [84] Sultan S.M.: Computer assisted optimization of a flow-injection method for the assay of promethazine, chlorpromazine and trimeprazine in drug formulations. *Talanta* **40** (1990), 681–686.
- [85] Karpinska J., Misiuk W., Puzanowska-Tarasiewicz H.: Flow injection spectrophotometric determination of promazine hydrochloride and thioridazine hydrochloride. *Indian Journal of Chemistry A* **37** (1998), 1135–1139.
- [86] Kojlo A., Puzanowska-Tarasiewicz H., Martinez Calatayud J.: Immobilization of hexacyano-ferrate(III) for a flow injection-spectrophotometric determination of promazine. *Analytical Letters* **26** (1993), 593–604.
- [87] Nascentes C.C., Cárdenas S., Gallego M., Valcárcel M.: Continuous photometric method for the screening of human urines for phenothiazines. *Analytica Chimica Acta* **462** (2002), 275–281
- [88] Kojlo A., Calatayud J.M.: FIA-spectrophotometric determination of *N*-substituted phenothiazine derivatives by oxidation with a solid-phase reactor of manganese dioxide incorporated in polyester resin beads. *Talanta* **42** (1995), 909–913.
- [89] Kojlo A., Puzanowska-Tarasiewicz H., Martinez Calatayud J.: Spectrophotometric determination of promazine with an oxidative column in FIA manifolds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **10** (1992), 785–788.
- [90] Sultan S.M.: Flow-injection method for the assay of phenothiazine neuroleptics in pharmaceutical preparations using ammonium metavanadate. *Analyst* **116** (1991), 177–181.
- [91] Wang Y.P.: Spectrophotometric determination of phenothiazines in pharmaceuticals by flow-injection analysis. *Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi* **30** (1999), 133–134. *Chem. Abstr.* **130**:272128
- [92] Němcová I., Nesměrák K., Rychlovský P., Koutníková J.: FIA titrations of phenothiazine derivatives in aqueous micellar and non-aqueous media. *Talanta* **65** (2005), 632–637.
- [93] Georgiou C.A., Koupparis M.A.: Automated flow injection spectrophotometric non-aqueous pseudotitrations of amines and their hydrohalide salts. *Analyst* **113** (1988), 755–760.

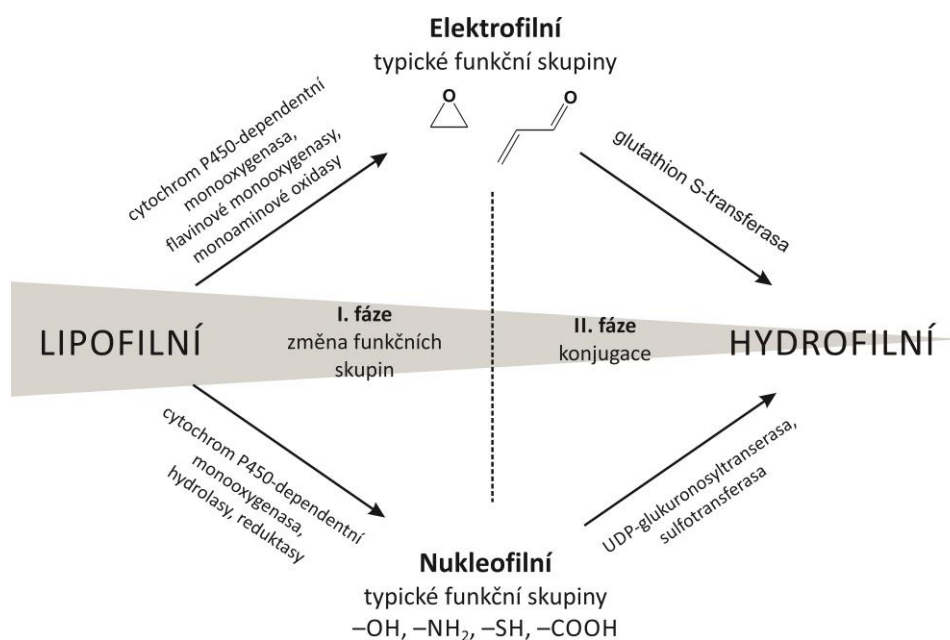


- [94] Nesměrák K., Červený V., Hraníček J., Rychlovský P.: A spectrofluorimetric determination of phenothiazine derivatives after their photooxidation or chemical or electrochemical oxidation in a flow injection arrangement. *Microchemical Journal* **106** (2013), 226–232.
- [95] Paduszek B., Kalinowski M.K.: Redox behaviour of phenothiazine and phenazine in organic solvents. *Electrochimica Acta* **28** (1983), 639–642.
- [96] Laassis B., Aaron J.J., Mahedero M.C.: Photochemically induced fluorescence determination of biomedically important phenothiazines in aqueous media at different pH values. *Analytica Chimica Acta* **290** (1994), 27–33.
- [97] Puzanowska-Tarasiewicz H., Kuzmicka L., Karpinska J., Mielech-Lukasiewicz K.: Efficient oxidizing agents for determination of 2,10-disubstituted phenothiazines. *Analytical Science* **21** (2005), 1149–1153.
- [98] Rocha D.L., Kamogawa M.Y., Rocha F.R.P.: A critical review on photochemical conversions in flow analysis. *Analytica Chimica Acta* **896** (2015), 11–33.

### 3 Elektroanalytické metody v predikci metabolického osudu farmak

#### 3.1 Elektroanalytická chemie a metabolismus

Biotransformační reakce využívá lidstvo od nepaměti (příprava alkoholických nápojů, fermentace), studium jejich podstaty začalo ale až s rozvojem organické chemie na počátku 19. století, kdy byly popsány první biotransformační reakce (konjugace benzoové kyseliny s glycinem) [1]. K hlubšímu pochopení podstaty biotransformace vedly studie enzymů, které spolu s identifikacemi metabolitů jednotlivých látek daly vznik samostatné vědní oblasti studující biotransformaci farmak. Za zakladatelský text je považována kniha R. T. Williamse *Detoxification Mechanisms* z roku 1947 [2]. Ve druhém vydání této knihy z roku 1959 bylo formulováno dodnes používané rozdělení na dvě fáze biotransformace (obr. 3.1): první, zahrnující zejména oxidační (méně pak redukční či hydrolytické) reakce, a druhou, v níž je metabolit z první fáze konjugován s endogenními sloučeninami (glukuronová kyselina, glycin, aj). Podrobnosti o současném pojetí biotransformace farmak lze nalézt v celé řadě monografií [3, 4].



**Obr. 3.1** Schématické znázornění fází metabolismu a reakcí v nich probíhajících (v některých případech může být pořadí fází obrácené).

Znalost biotransformačních reakcí je velmi významná zejména při studiu účinku již používaných farmak a vývoji farmak nových [4, 5]. Studium biotransformace farmak *in vivo* je složité a obtížné, proto se k němu – alespoň v prvním přiblížení – využívá jednodušších *in vitro* modelů [6, 7]. K nejvýznamnějším *in vitro* modelům patří elektrochemický model I. fáze biotransformace, který je založen na podobnosti oxidačně-redukčních reakcí na elektrodě s oxidačně-redukčními enzymatickými reakcemi probíhajícími během I. fáze biotransformace [8, 9]. Tento model je předmětem zájmu interdisciplinárního oboru vzniklého v 70. letech 20. století – *elektrofarmakologie* [10]. Elektrochemický model biotransformace spočívá ve využití elektrolýzy studované látky (potenciálního nebo již používaného farmaka), obvykle v nevodném prostředí. Kromě elektrochemických důvodů (rozpuštěnost studovaných látek, širší anodické potenciálové okno) je hlavním důvodem pro použití takového zdánlivě nebiologického zjištění, že některé z metabolických reakcí probíhají v prostředí lipofilní povahy (fosfolipidové membrány) a že ke správné funkci enzymu postačuje monomolekulární vrstva vody na jeho povrchu [11, 12]. Z elektroanalytických technik jsou využívány především stejnosměrná (DC) voltametrie a cyklická voltametrie a coulometrie, jimiž se studují základní elektrochemické parametry studovaných látek (oxidačně-redukční potenciály, počty

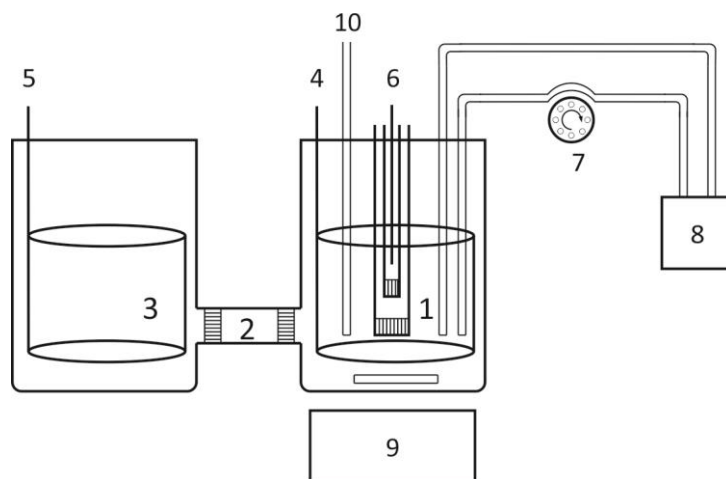
vyměňovaných elektronů) a mechanismus reakce. K přípravě oxidačních nebo redukčních produktů je využívána preparativní elektrolýza ve spojení se separačními a spektrálními metodami, zejména hmotnostní spektrometrií. Toto spojení může být buď nepřímé, kdy jsou v průběhu elektrolýzy (nebo až po jejím ukončení) odebírány produkty elektrochemické reakce a následně analyzovány pomocí separačních technik ve spojení s hmotnostní detekcí (výjimečně s jinou spektrální technikou, například s nukleární magnetickou resonancí [13]). Novější je on-line přístup, ve kterém je elektrochemická cela přímo spojena s hmotnostním detektorem [14], sama konstrukce elektrochemických cel je velmi rozmanitá, od tenkovrstvých přes průtokové cely [15], až po uspořádání typu lab-on-chip [16, 17].

Tento čistě instrumentální přístup, při němž jsou reakce katalyzované oxidoreduk-tasami zcela nahrazeny redoxními reakcemi na elektrodě, nabízí rychlý a levný způsob získání informací zejména o těch atomech ve struktuře molekuly, na kterých budou přednostně probíhat změny souvisící s metabolismem studovaných látek, dále o struktuře metabolitů (včetně možných izomerních forem), a konečně i o hodnotě elektrochemického potenciálu potřebného k přeměně studované látky na metabolity [18].

Omezením tohoto přístupu zůstává, že nezahrnuje reakce probíhající jiným než oxidačně-redukčním mechanismem a obvykle je omezen na I. fázi biotransformace (i když byly již publikovány práce aplikující tento model i na II. fázi biotransformace [19, 20]). Přesto, že se jedná pouze o model, který nemůže nahradit *in vivo* metabolické studie, takto získané informace se v řadě případů ukázaly ve velmi dobré korelaci s výsledky získanými reakcemi enzymatickými [21], a mohou tak poskytnout představu o pravděpodobném průběhu metabolismu studované látky. Přehled o studovaných látkách přinášejí přehledné články [22, 23]. Aplikační oblastí modelu je vývoj farmak [24], toxikologie [25], forenzní analýza (simulace metabolismu drog [26], dopingová problematika [27]), ochrana životního prostředí [28] a mnohé další.

### 3.2 Studované látky

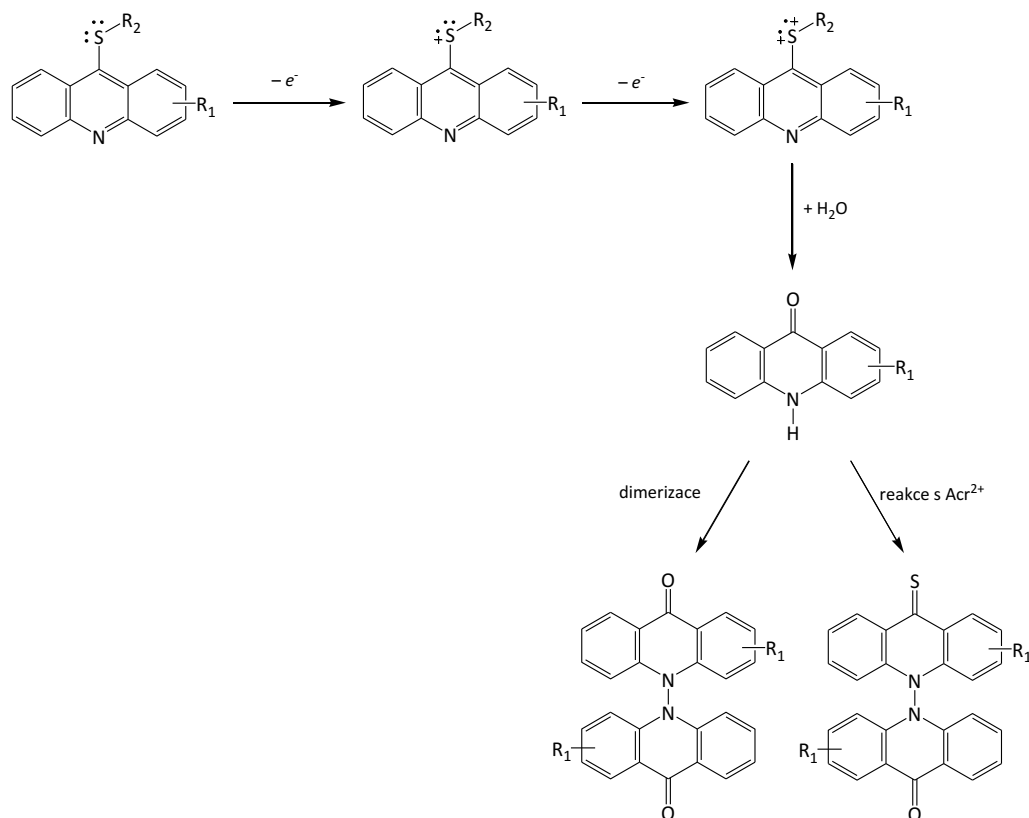
V naší laboratoři jsme systematicky studovali elektrooxidaci čtyř sérií nově syntetizovaných potenciálních farmak jako modely jejich možných metabolických přeměn. Ke studiu jsme používali off-line metodiku. Elektrolýza probíhala v námi navržené cele H-typu (obr. 3.2), sestávající ze tří prostorů oddělených fritami: pracovního prostoru, solného můstku, a prostoru pomocné elektrody (protielektrody). Jako pracovní elektroda byla používána Fischerova síťková platinová elektroda. Průběh elektrolýzy byl kontinuálně sledován pomocí UV/Vis spektrofotometrie; elektrolyzovaný roztok byl čerpán pomocí peristaltické pumpy do průtokové kyvety spektrofotometru a ihned vrácen zpět do elektrolyzéro. Po ukončení elektrolýzy byl elektrolyzovaný roztok odpařen do sucha na rotační vakuové odparce, produkty elektrolýzy extrahovány vhodným organickým rozpouštědlem a analyzovány pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.



**Obr. 3.2** Používaná aparatura pro preparativní elektrolýzu: 1) pracovní prostor, v němž probíhá elektrolýza, 2) solný můstek, 3) prostor pomocné elektrody, 4) pracovní Fischerova síťková platinová elektroda, 5) pomocná Fischerova síťková platinová elektroda (protielektroda), 6) referenční Pleskovova elektroda, 7) peristaltická puma, 8) spektrofotometr, 9) magnetické míchadlo, 10) přívod argonu.

### 3.2.1 Deriváty thioakridinu

Ve dvou navazujících studiích [29, 30 ► příloha C] jsme studovali elektrochemickou oxidaci série třinácti derivátů 9-(alkylthio)akridinu, nově syntetizovaných látek s antiprotozoálními [31] a antibiotickými vlastnostmi [32]. Pomocí výše uvedené metodiky bylo navrženo následující obecné schéma elektrooxidace těchto látek (obr. 3.3): elektrochemická oxidace začíná na atomu síry (který má dva volné elektronové páry) vázaném v pozici 9 akridinového kruhu. Odtržením jednoho elektronu z tohoto atomu vzniká radikálkationt, který je dále oxidován na dikationt. Reakcí dikationtu se stopovými množstvími vody a eliminací alkylthioskupiny vznikají odpovídající 9-akridinony, které dále poskytují různé typy dimerů. Pravděpodobnost tohoto schématu z hlediska metabolismu je podpořena v literatuře popsanou oxidací nesubstituovaného akridinu enzymy z potkaních jater, vedoucí rovněž ke vzniku 9-akridinonu [33].

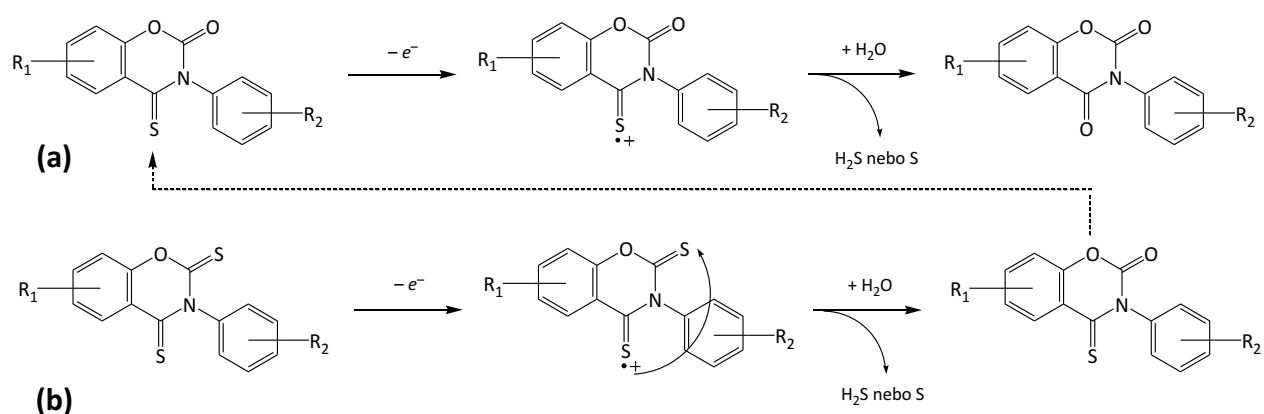


**Obr. 3.3** Navržené schéma elektrochemické oxidace derivátů 9-(alkylthio)akridinu (upraveno podle [30]).

### 3.2.2 Deriváty benzoxazinu

Tématem naší druhé studie [34 ► příloha D] byly deriváty benzoxazinu, u nichž byla prokázána aktivita bakteriostatická, imunomodulační, ale zejména antimykobakteriální [35]. Studovali jsme sérii čtyřiceti derivátů, z nichž šestnáct bylo deriváty 4-thioxobenzo[*e*][1,3]oxazin-2-onu (dále jen thioxobenzoxazin), a dvacet čtyři látek bylo deriváty benzo[*e*][1,3]oxazin-2,4-dithionu (dále jen benzoxazindithion).

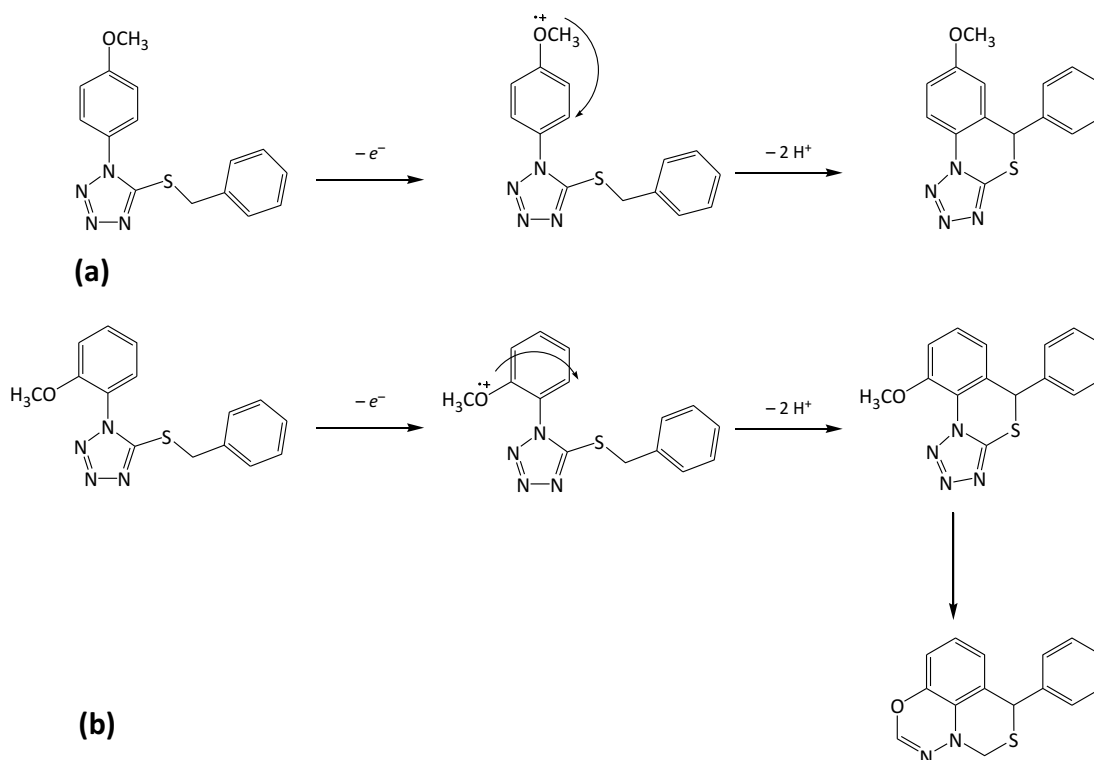
Na základě zjištěných produktů elektrooxidace, spolu s výsledky kvantově-chemických výpočtů (lokalizace HOMO orbitalů) bylo navrženo následující obecné schéma elektrooxidace obou studovaných sérií benzoxazinu (obr. 3.4). Elektrochemická oxidace je zahájena odtržením elektronu z atomu síry vázaného v pozici 4 benzoxazinového skeletu za vzniku radikálu s krátkou dobou života. V případě benzoxazindithionů je náboj translokován na atom síry v pozici 2. V obou případech následuje reakce se stopovými množstvími vody vedoucí k substituci atomu síry za atom kyslíku (z metabolického hlediska jde o oxidační desulfuraci [36]). Z benzoxazindithionů tak vznikají odpovídající thioxobenzoxazinony, podléhající další oxidaci až na výsledné benzoxazindiony. Tyto výsledky podporují hypotézu vysvětlující zvýšení antimykobakteriální aktivity benzoxazinů náhradou atomů kyslíku v pozici 2 a 4 benzoxazinového skeletu za atomy síry, jak bylo zjištěno ve studii [35], neboť je velmi pravděpodobné, že tato aktivita bude spojena s metabolismem benzoxazinů.



**Obr. 3.4** Navržené schéma elektrochemické oxidace (a) thioxobenzoxazinů a (b) benzoxazindithionů (upraveno podle [34]).

### 3.2.3 Deriváty 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolu

Naše třetí studie [37 ► příloha E] z oblasti elektrochemického modelování metabolismu se zaměřila na devatenáct derivátů 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolu, patřících mezi potenciální antituberkulotika [38]. Bylo zjištěno, že mechanismus elektrooxidace je závislý na pozici methoxyskupiny vázané na fenyl (obr. 3.5). Odtržením elektronu z methoxyskupiny vzniká radikálkationt s krátkou dobou života. Náboj je následně translokován do *ortho* pozice fenylového kruhu a reakcí s methylenovou skupinou zbývajícího benzylsulfanylu dojde k uzavření nového kruhu. V případě 2-methoxyderivátů byl navíc pozorován rozpad tetrazolového kruhu pravděpodobně v důsledku vyššího potenciálu, při němž probíhala elektrolýza. V biotransformaci by se nejspíše jednalo o *O*-demethylaci katalyzovanou monoaminoxidasou, následovanou uzavřením nového kruhu v molekule metabolitu [39].



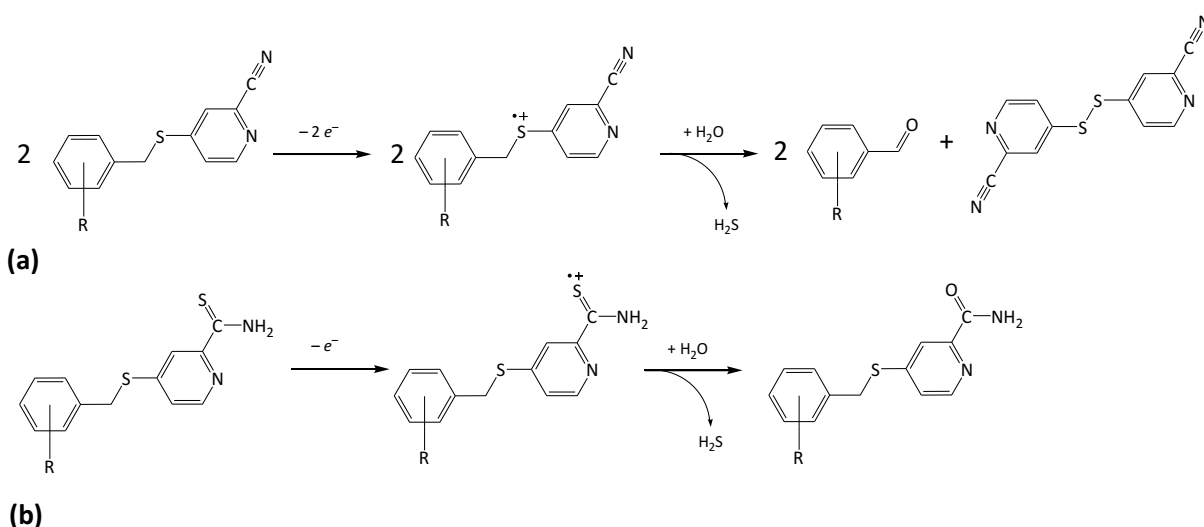
**Obr. 3.5** Navržené schéma elektrochemické oxidace (a) 1-(4-methoxyfenyl)-5-benzylsulfanyltetrazolů a (b) 1-(2-methoxyfenyl)-5-benzylsulfanyltetrazolů (upraveno podle [37]).



### 3.2.4 Deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridinu

Elektrochemická oxidace série dvaceti dvou derivátů 4-(benzylsulfanyl)-pyridinu byla studována v naší studii [40 ► příloha F]. Deriváty patřily, podle funkční skupiny v pozici 2 pyridinového kruhu, mezi karbonitrily nebo karbothioamidy. Obecně platí, že karbonitrily jsou oxidovány při vyšších potenciálech než obdobně substituované deriváty karbothioamidu.

Mechanismus elektrochemické oxidace je následující (obr. 3.6). V případě 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilů je oxidace zahájena odtržením elektronu z atomu síry na benzensulfanylu. Vzniklý radikálkationt zaniká tak, že reakcí páru těchto radikálů se stopovými množstvími vody v rozpouštědle vznikají dvě molekuly příslušně substituovaného benzaldehydu a jedna molekula 2-karbonitril-4-(2-(picolino-4-yl-nitril)disulfanyl)pyridinu. Naproti tomu elektrooxidace 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidů je sice rovněž jednoelektronovým procesem, při němž je ale elektron odtržen z atomu síry karbothioamidové skupiny. Stabilizace vzniklého radikálkationtu reakcí se stopovými množstvími vody vede ke vzniku příslušně substituovaného 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karboxamidu.



**Obr. 3.6** Navržené schéma elektrochemické oxidace (a) 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilů a (b) 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidů (upraveno podle [40]).

## Literatura

- [1] Murphy P.J.: Xenobiotic metabolism: a look from the past to the future. *Drug Metabolism and Disposition* **29** (2001), 779–780.
- [2] Neuberger A., Smith R.L.: Richard Tecwyn Williams: the man, his work, his impact. *Drug Metabolism Reviews* **14** (1983), 559–607.
- [3] *Drug Metabolism. Current Concepts*. C. Ionescu, M.R. Caira (eds.). Springer 2005.
- [4] *A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism*. Gary Evans (ed.). Boca Raton, CRC Press 2004.
- [5] *Drug Metabolism in Drug Design and Development. Basic Concepts and Practice*. D. Zhang, M. Zhu, W.G. Humphreys (eds.). Wiley 2008.
- [6] Sinz M.A.: *In vitro* and *in vivo* models of drug metabolism. In: *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions. Volume I*. A.V. Lyubimov (ed.). Wiley 2011, p. 41–71.
- [7] Venkatakrishnan K., von Moltke L.L., Obach R.S., Greenblatt D.J.: Drug metabolism and drug interactions: application and clinical value of *in vitro* models. *Current Drug Metabolism* **4** (2003), 423–459.
- [8] Lohmann W., Karst U.: Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism. Strategies, advantages and limitations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **391** (2008), 79–96.
- [9] Alvarez-Lueje A., Bollo S.: Stability and drug metabolism assessed by electrochemical methods. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **13** (2010), 712–727.
- [10] *Electropharmacology*. G.M. Eckert, F. Gutmann, H. Keyzer (eds.). Boca Raton, CRC Press 2004.
- [11] Kulschewski T., Pleiss J.: Simulation of enzymes in organic solvents. In: *Protein Engineering Handbook. Volume 3*. S. Lutz, U.T. Bornscheuer (eds.). Wiley 2013, p. 407–420.
- [12] Klibanov A.M.: Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409** (2001), 241–246.
- [13] Simon H., Melles D., Jacquilleot S., Sanderson P., Zazzeroni R., Karst U.: Combination of electrochemistry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for metabolism studies. *Analytical Chemistry* **84** (2010), 8777–8782.
- [14] Bussy U., Boisseau R., Thobie-Gautier Ch., Boujtita M.: Electrochemistry-mass spectrometry to study reactive drug metabolites and CYP450 simulations. *Trends in Analytical Chemistry* **70** (2015), 67–73.
- [15] Gul T., Bischoff R., Permentier H.P.: Electrosynthesis methods and approaches for the preparative production of metabolites from parent drugs. *Trends in Analytical Chemistry* **70** (2015), 58–66.
- [16] van den Brink F.T.G., Olthuis W., van den Berg A., Odijk M.: Miniaturization of electrochemical cells for mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry* **70** (2015), 40–49.
- [17] van den Brink F.T.G., Wigger T., Ma L., Odijk M., Olthuis W., Karst U., van den Berg A.: Oxidation and adduct formation of xenobiotics in a microfluidic electrochemical cell with boron doped diamond electrodes and an integrated passive gradient rotation mixer. *Lab on a Chip* **16** (2016), 3990–4001.

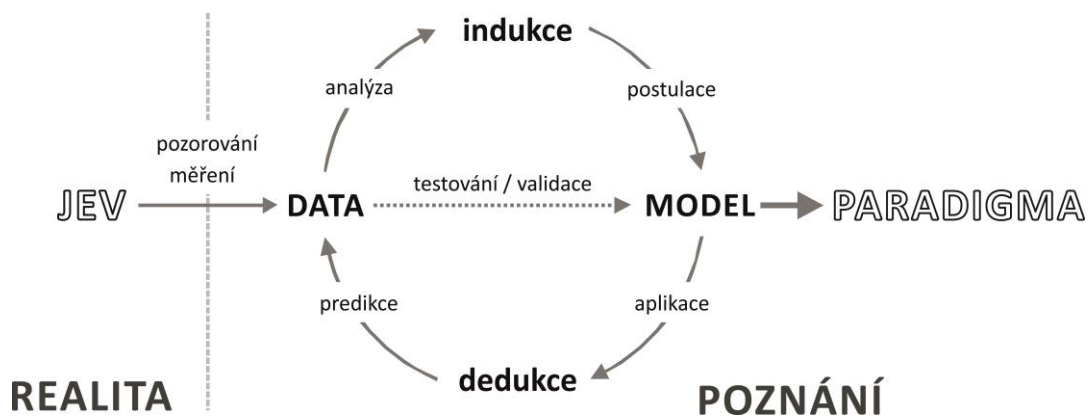
- [18] Nowak P., Woźniakiewicz M., Kościelniak P.: Simulation of drug metabolism. *Trends in Analytical Chemistry* **59** (2014), 42–49.
- [19] Lohmann W., Karst U.: Electrochemistry meets enzymes: instrumental on-line simulation of oxidative and conjugative metabolism reactions of toremifene. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **394** (2009), 1341–1348.
- [20] Büter L., Vogel M., Karst U.: Adduct formation of electrochemically generated reactive intermediates with biomolecules. *Trends in Analytical Chemistry* **70** (2015), 74–91.
- [21] Jurva U., Wikström H.V., Weidolf L., Bruins A.P.: Comparison between electrochemistry/mass spectrometry and cytochrome P450 catalyzed oxidation reactions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **17** (2003), 800–810.
- [22] Baumann A., Karst U.: Online electrochemistry/mass spectrometry in drug metabolism studies: principles and applications. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **6** (2010), 715–731.
- [23] Faber H., Vogel M., Karst U.: Electrochemistry/mass spectrometry as a tool in metabolism studies. A review. *Analytica Chimica Acta* **834** (2014), 9–21.
- [24] Jurva U., Weidolf L.: Electrochemical generation of drug metabolites with applications in drug discovery and development. *Trends in Analytical Chemistry* **70** (2015), 92–99.
- [25] Bussy U., Boujtita M.: Advances in the electrochemical simulation of oxidation reactions mediated by cytochrome P450. *Chemical Research in Toxicology* **27** (2014), 1652–1668.
- [26] Mielczarek P., Raouf H., Kotlinska J.H., Stefanowicz P., Szewczuk Z., Suder P., Silberring J.: Electrochemical simulation of cocaine metabolism – a step toward predictive toxicology for drugs of abuse. *European Journal of Mass Spectrometry* **20** (2014), 279–285.
- [27] Jahn S., Beuck S., Moeller I., Thevis M., Karst U.: Using electrochemistry for metabolite simulation and synthesis in preventive doping research: application to the Rycal S107 and the PPAR $\delta$ -agonist GW1516. *Analytical Methods* **5** (2013), 1214–1224.
- [28] Lohmann W., Doetzer R., Guetter G., Van Leeuwen S.M., Karst U.: On-line electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry for the simulation of pesticide metabolism. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **20** (2009), 138–145.
- [29] Němcová I., Nesměrák K., Jelínek I., Němec I., Barbe J.: Characterisation of newly synthesized thioacridine derivatives, their voltammetric behaviour and electrophoretic determination. *Analytical Letters* **34** (2001), 1223–1232.
- [30] Nesměrák K., Němec I., Štícha M., Němcová I., Horká V.: Structure-property relationships of thioacridines; their electrochemical oxidation as a model of metabolic degradation. *Analytical Letters* **35** (2002), 1617–1629.
- [31] Obexer W., Schmid C., Barbe J., Galy P.J., Brun R.: Activity and structure relationship of acridine derivatives against African trypanosomes. *Tropical Medicine and Parasitology* **46** (1995), 49–53.
- [32] Nesměrák K., Pospíšek M., Zikánová B., Němec I., Barbe J., Gabriel J.: Effect of structure on antibiotic action of new 9-(ethylthio)acridines. *Folia Microbiologica* **47** (2002), 118–120.

- [33] McMurtrey K.D., Knight T.K.: Metabolism of acridine by rat-liver enzymes. *Mutation Research* **140** (1984), 7–11.
- [34] Nesměrák K., Němec I., Štícha M., Waisser K., Palát K.: Quantitative structure-property relationships of new benzoxazines and their electrooxidation as a model of metabolic degradation. *Electrochimica Acta* **50** (2005), 1431–1437.
- [35] Waisser K., Gregor J., Dostál H., Kuneš J., Kubicová L., Klimešová V., Kaustová J.: Influence of the replacement of the oxo function with the thioxo group on the antimycobacterial activity of 3-aryl-6,8-dichloro-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones and 3-arylquinazoline-2,4(1H,3H)-diones. *Il Farmaco* **56** (2001), 803–807.
- [36] Kertesz M.A.: Riding the sulfur cycle – metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **24** (2000), 135–175.
- [37] Nesměrák K., Doležal R., Hudská V., Bártil J., Štícha M., Waisser K.: Quantitative structure-electrochemistry relationship of 1-phenyl-5-benzyl-sulfanyltetrazaoles and their electrooxidation as a metabolic model. *Electroanalysis* **22** (2010), 2117–2122.
- [38] Waisser K., Adamec J., Doležal R., Kaustová J.: 1-Aryl-5-benzylsulfanyltetrazaoles, a new group of antimycobacterial compounds against potentially pathogenic strains. *Folia Microbiologica* **50** (2005), 195–197.
- [39] Baker G.B., Urichuk L.J., McKenna K.F., Kennedy S.H.: Metabolism of monoamine oxidase inhibitors. *Cellular and Molecular Neurobiology* **19** (1999), 411–426.
- [40] Nesměrák K., Toropov A.A., Toropova A.P.: Model for electrochemical parameters for 4-(benzyl-sulfanyl)pyridines calculated from the molecular structure. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **766** (2016), 24–29.

## 4 Elektroanalytická data v QSAR

### 4.1 Vztahy mezi strukturou a vlastnostmi chemických látek

Hledání obecných vztahů pro popis a následné pochopení reality je jedním z charakteristických znaků lidského myšlení. Snaha ustavit obecné či speciální modely pro nejrůznější situace a jejich aplikace na předpovídání následků je stará jako lidstvo samo [1, 2]. Realita, tedy svět kolem nás, je nám totiž přístupna jen prostřednictvím jevů, které můžeme pozorovat (měřit). Získáváme tak data (kvalitativní nebo kvantitativní), jejichž analýzou indukujeme (vyvozujeme, generalizujeme) obecné závěry, na základě kterých můžeme postulovat modely reality [3, 4]. Tyto modely aplikujeme na nové výskyty jevů prostřednictvím dedukce (odvozování, usuzování) a můžeme tak předpovídat, jaká data by měl nový výskyt jevu poskytnout. Díky tomu lze modely testovat a potvrzovat. Model, u něž se prokáže obecná platnost, se může stát paradigmatem, zásadním pojetím příslušného vědeckého oboru, které je obecně přijímáno a považováno za vzorové (v dané historické periodě). Vztah mezi realitou a naším poznáním, včetně způsobu odvozování, aplikace a verifikování modelů reality je uveden na obr. 4.1.



Obr. 4.1 Vztah mezi realitou a poznáním a způsob odvozování, aplikace a verifikace modelů reality.

V historii byly při tomto „hledání řádu“, vlastně snaze ustavit symbolický prostředek k přenosu informace, vyvinuty různé techniky (ostatně i písmo za svůj vznik vděčí tomuto úsilí, jak je patrné z prvních znakových systémů, například egyptských hieroglyfů). Za jeden z prvních takových způsobů v případě farmak bývá považována nauka o signaturách, zmiňovaná už Gaiem Pliniem Secundem v jeho *Naturalis historia* [5]. Je založena na morfologickém principu: potenciální léčivo (rostlina, minerál, živočich) ukazuje na základě kvality (tvar, barva, vůně) svoji schopnost, tedy kvantitu, léčit některý z orgánů lidského těla [6]. Na základě zevnějšku se tak utváří představa o vnitřku (podstatě a účinku). Příkladem může být užití vlašských ořechů k posílení mozku, neboť tvar jádra vlašského ořechu připomíná lidský mozek. Princip je známý jako *similia similibus curantur*, podobné se léčí podobným; jeho největším zastáncem byl slavný Paracelsus [7]. Princip byl ovšem využíván spíše obráceně, jako mnemotechnická pomůcka, jak si zapamatovat jaké léčivo je na jakou nemoc.

Teprve s poznáním chemické struktury látek v 19. století bylo možné hledat modely popisující vlastnosti látek v závislosti na jejich struktuře, na uspořádání atomů [8]. Došlo tak nejprve k formulaci řady empirických pravidel (např. stoupání bodu varu a tání v homologických řadách) nebo k postulaci periodického systému [9].

Z hlediska kvantifikace, tedy vyjádření jako matematické funkce, vztahu mezi strukturou chemické látky a její vlastností se zlomovým stal rok 1869, kdy Alexander Crum Browne a Thomas R. Fraser formulovali předpoklad [10, 11], že fyziologická aktivita látek je funkcí jejich chemické struktury

$$\Phi = f(C) \tag{4.1}$$

kde  $\Phi$  je obecná fyziologická aktivita látky (kvantifikovatelná, např. jako dávka či koncentrace potřebná k vyvolání sledovatelné biologické aktivity) a  $C$  chemická struktura látky. Za jedno z prvních (ještě nekvantitativních) potvrzení platnosti tohoto vztahu je považována syntéza fenazonu, který byl jako první cíleně syntetizované léčivo připraven na základě strukturní analogie s chininem roku 1883 Ludwigem Knorrem [12, 13].

Rozšíření Crum Brownovy-Fraserovy teorie na fyzikálně-chemické vlastnosti látek přinesla roku 1884 práce Edmunda J. Millse [14], který odvodil kvantitativní vztahy mezi strukturou a bodem varu nebo bodem tání pro homologické řady. Předpovězené

hodnoty z těchto vztahů se s experimentálními hodnotami shodují s přesností jednoho stupně Celsia. Neméně významným byl poznatek Charlese Richeta [15], že cytotoxicita jednoduchých organických látek je nepřímo úměrná rozdílu v jejich rozpustnosti ve vodě, tedy že rovnice (4.1) má spíše být vyjádřena jako

$$\Phi = f(\Delta C) \quad (4.2)$$

Následovaly další práce, přinášející první kvantitativní vztahy mezi strukturou a aktivitou látek [10, 16]. Fundamentální prací zobecňující tyto vztahy na prakticky libovolné vlastnosti chemických látek se stala roku 1935 publikovaná práce Louise Placka Hammetta [17], ve které studoval vliv substituentů na rychlostní konstanty reakcí série substituovaných organických kyselin. Vliv substituce, resp. změny rozložení elektronů ve sloučenině vlivem substituentu, na kvantitativní změnu vlastnosti (hodnotu rychlostní nebo rovnovážné konstanty) se mu podařilo vyjádřit rovnicí

$$\log k_X = \log k_H + \rho\sigma \quad (4.3)$$

kde  $k_X$  je rychlostní (nebo rovnovážná) konstanta reakce substituovaného derivátu,  $k_H$  rychlostní (rovnovážná) konstanta reakce nesubstituovaného derivátu (na místě substituentu je atom vodíku),  $\rho$  reakční konstanta, která je mírou citlivosti dané reakce na elektronický efekt substituentů (a je tedy charakteristická pro danou reakci) a  $\sigma$  je Hammettova konstanta substituentu, popisující – obecně, neboť je přenosná mezi jednotlivými reakcemi – vliv substituentu na rozložení elektronů v dané molekule. Rovnice (4.3) se stala jedním z prvních příkladů přístupu, který obdržel název lineární vztah Gibbsovy energie (Linear Free Energy Relationship, LFER) [18]. Hammettova  $\sigma$  konstanta se stala prvním deskriptorem, který umožnil kódování chemické informace do matematického vyjádření.

Protože Hammettův přístup bere do úvahy pouze elektronické efekty substituentů, ukázal se jako limitovaný. Tuto nevýhodu se pokusil roku 1952 odstranit Robert W. Taft rozdělením Hammettovy konstanty na příspěvky polární, sterické a rezonanční [19].

Významným mezníkem bylo rovněž zavedení deskriptorů struktury popisujících topologii molekul, které na základě teorie grafů odvolili John R. Platt [20] a Harry Wiener [21, 22].

V roce 1962 následovala zásadní práce Corvina Hansche, Toshio Fujity a kol. [23], kteří využili ke kvantitativnímu vyjádření závislost biologické aktivity látek na více parametrech a získali tak obecnou multiparametrovou rovnici

$$\log BA = a_1x_h + a_2x_e + a_3x_s + \dots + a_nx_n \quad (4.4)$$

kde  $BA$  je biologická aktivita,  $a_1$  až  $a_n$  jsou regresní váhy parametrů,  $x_h$  je experimentální nebo empirický parametr hydrofobicity (lipofility),  $x_e$  je experimentální nebo empirický parametr elektronových vlastností,  $x_s$  je experimentální nebo empirický parametr sterických vlastností, a  $x_n$  je experimentální nebo empirický parametr dalších možných vlastností.

O dva roky později Spencer M. Free a James W. Wilson publikovali přístup [24], který pro modelování vlastnosti chemické látky bere v úvahu přítomnost či nepřítomnost funkční skupiny či motivu na struktuře látky. Přístup má tu výhodu, že nevyžaduje znalost experimentálně dostupných konstant z jiných měření (proto bývá nazýván také metoda *de novo*). Matematicky jej lze vyjádřit rovnicí

$$BA = \sum_{i=1}^n I_i G_i + b \quad (4.5)$$

kde  $BA$  je biologická aktivita,  $I_i$  je indikátorová konstanta přítomnosti či nepřítomnosti dané funkční skupiny či strukturního motivu (konstanta nabývá hodnoty  $I = 1$  pro přítomnost a  $I = 0$  při nepřítomnosti funkční skupiny či strukturního motivu),  $G_i$  je příspěvek přítomnosti dané funkční skupiny či strukturního motivu k aktivitě látky a  $b$  je aktivita základní sloučeniny (nesubstituované).

Díky výše uvedeným pracím došlo k postulaci paradigmatu kvantitativních vztahů mezi strukturou a aktivitou, pro něž se souhrnně ujal název QSAR z anglického quantitative structure-activity relationships [25]. Pod pojmem aktivita se zahrnuje nejen aktivita biologická, ale i nejrůznější fyzikálně-chemické vlastnosti látek (tab. 4.1).



**Tabulka 4.1**

Používané akronymy pro podobory QSAR.

zkratka	anglický název
QSBR	quantitative structure–biodegradability relationship
QSCR	quantitative structure–chromatography relationship
QSER	quantitative structure–electrochemistry relationship <i>nebo</i> quantitative structure–enantioselectivity relationship
QSFR	quantitative structure–function relationship
QSKR	quantitative structure–kinetics relationship
QSPR	quantitative structure–property relationship
QSRR	quantitative structure–reactivity relationship <i>nebo</i> quantitative structure–retention relationship
QShAR	quantitative shape–activity relationship
QSTR	quantitative structure–toxicity relationship

Od osmdesátých let 20. století jsou pro využití v QSAR navrhovány a využívány různé druhy molekulárních, topologických a geometrických deskriptorů [26, 27]. V úvahu, zejména u biologických účinků, je bráno i prostorové uspořádání molekul a vzájemné slabé mezimolekulové interakce (tzv. 3D QSAR, cit. [28, 29]). Literatura o QSAR je velmi obsáhlá, počet publikovaných článků v letech 1966–2015 se odhaduje na 11 000 prací, z čehož je asi 82 % původních článků [30]. K hlubšímu úvodu do této metodiky slouží kromě výše citovaných prací například monografie Hansche a Lea [31], Kubinyiho [16], Williamse [32]; z českých autorů si zaslouží zmínku monografie Exnera [33], Tichého [34] a Kuchaře a Rejholce [35].

## 4.2 Vztah oxidačně-redukčního potenciálu a struktury

Dochází-li při chemické reakci k přenosu elektronů, lze ochotu chemické látky odevzdávat, resp. přijímat, elektrony charakterizovat pomocí oxidačně-redukčního potenciálu. Ten je snadno dostupný pomocí voltametrických technik, u nichž je získáván signál, který je výsledkem interakce elektronů přímo se studovanou molekulou; podle používané techniky to může být půlvlnový potenciál  $E_{1/2}$  změřený DC voltametrií nebo

potenciál píku  $E_p$  změřený například diferenční pulzní voltametrií nebo cyklickou voltametrií.

Vztahu mezi strukturou a oxidačně-redukčním potenciálem si povšiml již Jaroslav Heyrovský, který v roce 1934 definoval pravidlo konjugace [36]: „*Polarografická redukce proběhne tím snáze, čím větší je počet konjugovaných vazeb v organické molekule.*“ Následujícím empirickým pravidlem bylo pravidlo elektronegativity formulované roku 1938 Masuzo Shikatou a I. Tachim [37]: „*Půlvolný potenciál bude tím kladnější, čím elektro-negativnější je substituent.*“

Kvantifikaci vztahu struktura-oxidačně-redukční potenciál bylo možné provést po zavedení Hammettovy  $\sigma$  konstanty. Mezi rovnovážnou konstantou oxidačně-redukční reakce a půlvolným potenciálem platí vztah

$$E_{1/2} = -\frac{RT}{nF} \ln k \quad (4.6)$$

kde  $E_{1/2}$  je půlvolný potenciál látky (V),  $R$  universální plynová konstanta (8,314 J K<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup>),  $T$  termodynamická teplota (K),  $n$  počet vyměňovaných elektronů,  $F$  Faradayova konstanta (96 485 C mol<sup>-1</sup>) a  $k$  rovnovážná konstanta oxidačně-redukční reakce, které látka podléhá. Kombinací tohoto vztahu s Hammettovou rovnicí (4.3) lze získat Hammettovu rovnici pro půlvolné potenciály

$$(E_{1/2})_X = (E_{1/2})_H + \rho\sigma \quad (4.7)$$

kde  $(E_{1/2})_X$  je půlvolný potenciál substituovaného derivátu a  $(E_{1/2})_H$  půlvolný potenciál nesubstituovaného derivátu.

Tento základní princip, podobně jako celá QSAR, je dále rozšiřován, přičemž jsou uplatňovány další druhy deskriptorů. Monograficky zpracoval vliv substituentů v organické polarografii Zuman [38, 39]. Podobor QSAR zabývající se vztahy mezi strukturou a elektrochemickými vlastnostmi získal v 80. letech 20. století označení QSER, quantitative structure-electrochemistry relationships [40, 41]. Příklady novějších prací na tomto poli jsou uvedeny v tab. 4.2.

**Tabulka 4.2**

Příklady novějších studií pro QSAR půlvolného potenciálu: použité deskriptory, studované deriváty, počet látek v korelační rovnici ( $n$ ).

deskriptor	deriváty	$n$	ref.
Hammettova $\sigma$ konstanta	aziridinylchinoidy	40	[40]
	benzochinony, 1,4-	61	[40]
	chrom-aminokarbenové komplexy	11	[42]
	karbonyly, $\alpha$ -, $\beta$ - nenasycené	20	[43]
	ketony, $\alpha$ -, $\beta$ - nenasycené	26	[44]
	naftochinony	21	[45]
	naftochinony, 1,4-	30	[40]
kvantově-chemické	3,4-dihydroxy-3-cyklobuten- 1,2-diony	5	[46]
	anthrachinony	5	[47, 48]
	chinony	8	[49, 50]
	chinony	10	[51]
	chinony	18	[52]
	jodobenzeny	17	[53]
	pyridinové a benzenové estery	24	[54]
molekulární deskriptory	aldehydy a ketony	73	[55]
	anabolické steroidy	38	[56]
	anthrachinony, 9,10-	33	[57]
	různé	51	[58]
	různé, data převzata z [59]	68	[60]
různé	9,10-anthrachinony, data převzata z [57]	33	[61, 62]
	chinony	26	[63]
	chinony	9	[64]
	chlorované organické deriváty	21	[65,66]
	fenolické sloučeniny	22	[67]
	fenylchinolinylethyny	30	[68]
	nitrobenzeny	15	[69]
	různé	18	[70]
	steroidy	40	[71]

*Tabulka 4.2 pokračuje na další straně.*

*Pokračování tabulky 4.2 z předchozí strany.*

deskriptor	deriváty	<i>n</i>	ref.
topologické indexy	aldehydy	12	[59]
	benzenoidy	36	[72, 73]
	chinony	6	[59]
	dusíkaté heterocykly	9	[59]
	halogenderiváty	12	[59]
	karboxylové kyseliny a jejich deriváty	15	[59]
	kondenzované benzenoidy	31	[74]
	nitroderiváty	20	[59]

### 4.3 Studované látky

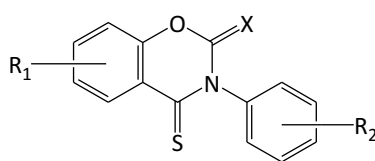
V naší laboratoři jsme studovali vztah mezi strukturou a elektrochemickým oxidačním potenciálem pro čtyři skupiny látek, patřících mezi potenciální farmaka.

Naším hlavním příspěvkem v této oblasti je zejména zavedení nového druhu topologických deskriptorů pro QSER. Pro popis struktury jsme využili lineární notace SMILES (angl. simplified molecular input line entry specification; český překlad se nepoužívá), zavedené Wingerem [75, 76], která jednoznačným způsobem popisuje strukturu molekuly pomocí řetězců znaků ASCII. Podrobnosti o využití SMILES v oblasti QSAR jsou uvedeny v naší přehledové práci [77 ► příloha G].

#### 4.3.1 Deriváty benzoxazinu

Pro sérii čtyřiceti derivátů benzoxazinu (obr. 4.2), patřících mezi potenciální antimykobakteriální látky byla provedena QSER analýza s využitím řady deskriptorů.

V naší první studii [78 ► příloha D] jsme provedli QSER analýzu s využitím Hammettových  $\sigma$  konstant substituentu a získali pro půlvlnové potenciály oxidace těchto látek v prostředí acetonitrilu QSER rovnice s koeficientem determinace  $r^2 = 0,897$ . Ukázalo se, že půlvlnové potenciály dobře korelují i s kvantově-chemicky vypočítanými



X = O, S

R<sub>1</sub> = 6-CH<sub>3</sub>, 6-Cl, 6-OCH<sub>3</sub>, 7-CH<sub>3</sub>, 7-OCH<sub>3</sub>

R<sub>2</sub> = 3-Cl, 3-F, 3, 4-Cl<sub>2</sub>, 4-Br, 4-CF<sub>3</sub>, 4-CH<sub>3</sub>, 4-Cl, 4-CN, 4-F

**Obr. 4.2** Chemické struktury studovaných derivátů benzoxazinu

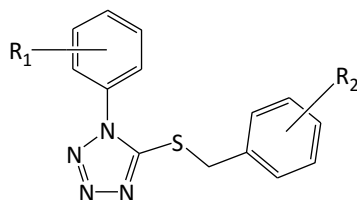
hodnotami energií HOMO orbitalů,  $r^2 = 0,805$ ; čímž bylo možné lokalizovat místa v molekule, z nichž jsou elektrony při oxidaci odebírány a napomoci tak řešení mechanismu elektrooxidace benzoxazinů (kap. 3.2.2).

Námi publikovaná data se stala podkladem práce Liua a kol. [79], kteří s použitím čtyř kvantově-chemických deskriptorů získali multiparametrovou korelační rovnici s  $r^2 = 0,946$  a potvrdili závěry z naší výše uvedené studie.

Pro tuto skupinu látek jsme pak v naší další studii [80 ► příloha H] zavedli topologické deskriptory založené na SMILES, přičemž se jedná o první práci tohoto druhu. Výsledná QSER korelace je plně srovnatelná s výše uvedenou korelací s Hammettovými  $\sigma$  kontantami, její  $r^2 = 0,882$ .

#### 4.3.2 Deriváty 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolu

Vztah mezi strukturou a půlvolnými potenciály oxidace devatenácti derivátů 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolu (obr. 4.3), patřících opět mezi potenciální



R<sub>1</sub> = 2-OCH<sub>3</sub>, 3, 4-Cl<sub>2</sub>, 4-Br, 4-CH<sub>3</sub>, 4-Cl, 4-OCH<sub>3</sub>

R<sub>2</sub> = 3-Cl, 3-OCH<sub>3</sub>, 4-Br, 4-CF<sub>3</sub>, 4-CH<sub>3</sub>, 4-Cl, 4-F, 4-OCH<sub>3</sub>

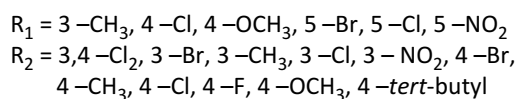
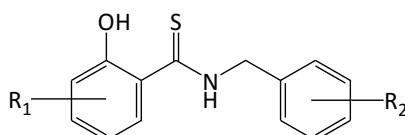
**Obr. 4.3** Chemické struktury studovaných derivátů 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolu

antimykobakteriální látky, jsme v naší první studii [81 ► příloha E] studovali pomocí devíti kvantově-chemických deskriptorů (Hammettovy  $\sigma$  konstanty substituentu nebylo možné z důvodu substituce do *ortho*-polohy využít). Statisticky nejtěsnější korelace bylo dosaženo s využitím energie HOMO orbitalu,  $r^2 = 0,98$ .

V navazující studii [82 ► příloha CH] jsme opět aplikovali deskriptory založené na SMILES, a získali řadu QSER vztahů, které sice nedosahovaly statistické kvality korelace založené na energii HOMO orbitalu, ale umožnily identifikaci strukturálních motivů, které přispívají k zvyšování, resp. snižování, hodnoty půlvlnového potenciálu.

### 4.3.3 Deriváty *N*-benzylsalicylthioamidu

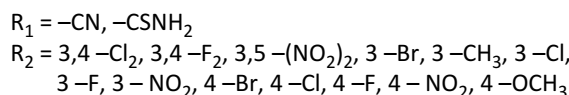
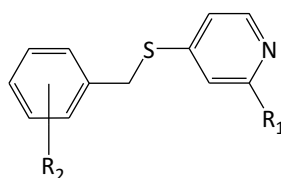
Deriváty *N*-benzylsalicylthioamidu (obr. 4.4), syntetizované jako potenciální antituberkulotika byly předmětem naší studie [83 ► příloha I]. Analýza QSER, založená na SMILES, byla provedena pro 24 látek. Naměřené hodnoty půlvlnových potenciálů byly analyzovány pro tři náhodná rozdělení látek do čtyř sad (subtrénovací, kalibrační, testovací a validační). Nalezené QSER vztahy vykazovaly pro testovací sadu  $r^2 > 0,91$ , navíc umožnily i identifikovat strukturální motivy, které mají vliv na hodnotu půlvlnového potenciálu látky.



**Obr. 4.4** Chemické struktury studovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu

#### 4.3.4 Deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridinu

Naše studie [84 ► příloha F] se věnovala QSER analýze půlvolných potenciálů dvaceti dvou 4-(benzylsulfanyl)pyridinů, z nichž třináct patřilo mezi karbonitrily a zbývajících devět mezi karbothioamidy. Ve studii byly porovnány korelační rovnice využívající Hammettovy  $\sigma$  konstanty substituentu s korelačními rovnicemi založenými na SMILES pro tři náhodná rozdělení derivátů do tří sad (trénovací, kalibrační a validační). Bylo zjištěno, že rovnice založené na SMILES mají ze statistického hlediska větší platnost (vyšší koeficienty determinace), navíc tento přístup umožňuje identifikovat vliv jednotlivých strukturních motivů na hodnotu půlvolného potenciálu.



**Obr. 4.5** Chemické struktury studovaných derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridinu

#### Literatura

- [1] Humphreys P.: *Extending Ourselves. Computational Science, Empiricism, and Scientific Method.* Oxford University Press 2004.
- [2] Khun T.S.: *The Structure of Scientific Revolutions.* 3rd Edition. Chicago, The University of Chicago Press 1996.
- [3] Gerlee P., Lundh T.: *Scientific Models. Red Atoms, White Lies and Black Boxes in a Yellow Book.* Springer 2016.
- [4] Gelfert A.: *How to Do Science with Models. A Philosophical Primer.* Springer 2016.
- [5] *Pliny Natural History. With an English Translation in Ten Volumes. Vol. VII (Libri XXVI–XXVII).* W.H.S. Jones (ed.) Cambridge, Harvard University Press 1964, lib. XXVII, cap. 75.
- [6] Bennett B.C.: Doctrine of signatures: An explanation of medicinal plant discovery or dissemination of knowledge? *Economic Botany* **61** (2007), 246–255.

- [7] Pagel W.: *Paracelsus. An Introduction to Philosophical Medicine in the Era of the Renaissance*. 2nd edition. Basel, Karger 1982, p. 148–149.
- [8] Horvitz L.A.: *Eureka! Scientific Breakthroughs that Changed the World*. Wiley 2002.
- [9] Strathern P.: *Mendeleev's Dream. The Quest For the Elements*. New York, St Martins Press 2001.
- [10] Sellasie C.D.: History of quantitative structure-activity relationships. In: *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. Volume 1. Drug Discovery*. 6th Edition. D.J. Abraham (ed.). Wiley 2003, p. 1–48.
- [11] Crum Brown A., Fraser T.R.: On the connection between chemical constitution and physiological action. Part I. On the physiological action of the salts of the ammonium bases, derived from strychnia, brucia, thebaia, codeia, morphia, and nicotia. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* **25** (1869), 151–203.
- [12] Brune K., Hinz B.: History of analgesics. In: *Encyclopedia of Pain*. R.F. Schmidt RF, W.D. Willis (eds.). Springer, p. 899–904.
- [13] Nesměrák K.: Historie analgetik. *Bolest* **19** (2016), 103–112.
- [14] Mills E.J.: On melting-point and boiling point as related to chemical composition. *The Philosophical Magazine* **17** (1884), 173–187.
- [15] Richet C.: Rapport entre la toxicité et les propriétés physiques des corps. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales* **9** (1893), 775–776.
- [16] Kubinyi H.: *QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches*. Weinheim, VCH 1993.
- [17] Hammett L.P.: Some relations between reaction rates and equilibrium constants. *Chemical Reviews* **17** (1935), 125–136.
- [18] Hammett L.P.: Linear free energy relationships in rate and equilibrium phenomena. *Transactions of the Faraday Society* **34** (1938) 156–165.
- [19] Taft R.W.: Polar and steric substituent constants for aliphatic and *o*-benzoate groups from rates of esterification and hydrolysis of esters. *Journal of the American Chemical Society* **74** (1952), 3120–3128.
- [20] Platt J.R.: Influence of neighbor bonds on additive bond properties in paraffins. *The Journal of Chemical Physics* **15** (1947), 419–420.
- [21] Wiener H.: Influence of interatomic forces on paraffin properties. *The Journal of Chemical Physics* **15** (1947), 766.
- [22] Wiener H.: Structural determination of paraffin boiling points. *Journal of the American Chemical Society* **69** (1947), 17–20.
- [23] Hansch C., Maloney P.P., Fujita T., Muir R.M.: Correlation of biological activity of phenoxyacetic acids with Hammett substituent constants and partition coefficients. *Nature* **194** (1962), 178–180.
- [24] Free S.M., Wilson J.W.: A mathematical contribution to structure-activity studies. *Journal of Medicinal Chemistry* **7** (1964), 395–399.



- [25] Restrepo G., Harré R.: Mereology of quantitative structure-activity relationships models. *HYLE – International Journal for Philosophy of Chemistry* **21** (2015), 19–38.
- [26] Todeschini R., Consonni V.: *Molecular Descriptors for Chemoinformatics*. Vol. I.–II. 2nd Edition. Wiley 2009.
- [27] Todeschini R., Consonni V.: *Handbook of Molecular Descriptors*. Wiley 2000.
- [28] Kubinyi H.: *3D QSAR in Drug Design. Theory Methods and Applications*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers 2000.
- [29] Doucet J.P., Panaye A.: *Three Dimensional QSAR. Applications in Pharmacology and Toxicology*. CRC Press 2010.
- [30] Yousefinejad S., Hemmateenejad B.: Chemometrics tools in QSAR/QSPR studies: A historical perspective. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **149** (2015), 177–204.
- [31] Hansch C., Leo A.: *Exploring QSAR. Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*. American Chemical Society 1995.
- [32] Williams A.: *Free Energy Relationships in Organic and Bio-organic Chemistry*. Cambridge, The Royal Society of Chemistry 2003.
- [33] Exner O.: *Korelační vztahy v organické chemii*. Praha, SNTL/Alfa 1981.
- [34] Tichý M.: *Účinnost xenobiotik a chemická struktura*. Praha, Avicenum 1983.
- [35] Kuchař M., Rejholec V.: *Využití kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou*. Praha, Academia 1987.
- [36] Heyrovský J.: *A Polarographic Study of the Electro-kinetic Phenomena of Adsorption, Electro-reduction and Overpotential Displayed at the Dropping Mercury Cathode*. Paris, Hermann & Cie 1934.
- [37] Shikata M., Tachi I.: Polarographic studies with the dropping mercury cathode. Part LXXIV. The electronegativity rule of the reduction potential of organic compounds. *Collection of the Czechoslovak Chemical Communications* **10** (1938), 368–379.
- [38] Zuman P.: *Substituent Effects in Organic Polarography*. New York, Plenum Press 1967.
- [39] Zuman P.: *Vplyvy substituentov v organickej polarografii*. Bratislava, Alfa 1970.
- [40] Driebergen R.J.: Qualitative and quantitative aspects of structure-electrochemistry-cytotoxicity relationships of aziridinylquinones. *Pharmaceutisch Weekblad, Scientific Edition* **9** (1987), 288–290.
- [41] Driebergen R.J., Moret E.E., Janssen L.H.M., Blauw J.S., Holthuis J.J.M., Postma Kelder S.J., Verboom W., Reinhoudt D.N., Van der Linden W. E.: Electrochemistry of potentially bioreductive alkylating quinones. Part 3. Quantitative structure-electrochemistry relationships of aziridinylquinones. *Analytica Chimica Acta* **257** (1992), 257–273.
- [42] Irena Hoskovicová I., Roháčková J., Meca L., Tobrman T., Dvořák D., Ludvík J.: Electrochemistry of chromium(0)–aminocarbene complexes. The use of intramolecular interaction LFER for characterization of the oxidation and reduction centre of the complex. *Electrochimica Acta* **50** (2005), 4911–4915.

- [43] Moraleda A., El Abeda D., Pellissier H., Santelli M.: Linear relationships in  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds between the half-wave reduction potentials, the frontier orbital energies and the Hammett  $\sigma_p$  values. *Journal of Molecular Structure: Theochem* **760** (2006), 113–119.
- [44] Tömpe P., Clementis G., Petneházy I., Jászay Z.M., Toke L.: Quantitative structure–electrochemistry relationships of  $\alpha, \beta$ -unsaturated ketones. *Analytica Chimica Acta* **305** (1995), 295–303.
- [45] Elhabiri M., Sidorov P., Cesar-Rodo E., Gilles Marcou G., Lanfranchi D.A., Davioud-Charvet E., Horvath D., Varnek A.: Electrochemical properties of substituted 2-methyl-1,4-naphthoquinones: Redox behavior prediction. *Chemistry – A European Journal* **21** (2015) 3415–3424.
- [46] Xue Z.M., Chen C.H.: The relationship between structure and electrochemical property of cyano-imino derivatives of squaric acid. *Molecular Simulation* **32** (2006), 401–408.
- [47] Shamsipur M., Alizadeh K., Arshadi S.: Computational electrochemistry of aqueous two-electron reduction potentials of some amino-9,10-anthraquinone derivatives. *Journal of Molecular Structure: Theochem* **758** (2006), 71–74.
- [48] Shamsipur M., Mohammadi T., Alizadeh K., Arshadi S., Nichols R.J.: Electrochemical and computational studies of some 9,10-anthraquinone derivatives in acetonitrile solution. *Polish Journal of Chemistry* **79** (2005), 1379–1388.
- [49] Alizadeh K., Shamsipur M.: Calculation of the two-step reduction potentials of some quinones in acetonitrile. *Journal of Molecular Structure: Theochem* **862** (2008), 39–43.
- [50] Namazian M., Norouzi P., Ranjbar R.: Prediction of electrode potentials of some quinone derivatives in acetonitrile. *Journal of Molecular Structure: Theochem* **625** (2003), 235–241.
- [51] Namazian M., Norouzi P.: Prediction of one-electron electrode potentials of some quinones in dimethylsulfoxide. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **573** (2004), 49–53.
- [52] Cape J.L., Bowman M.K., Kramer D.M.: Computation of the redox and protonation properties of quinones: Towards the prediction of redox cycling natural products. *Phytochemistry* **67** (2006), 1781–1788.
- [53] Hemmateenejad B., Sanchooli M.: Substituent electronic descriptors for fast QSAR/QSPR. *Journal of Chemometrics* **21** (2007), 96–107.
- [54] Webster R.D., Bond A.M., Coomber D.C.: Correlation of voltammetric and spectroscopic data obtained from open- and closed-shell aromatic esters and those obtained from AM1 calculations. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **442** (1998), 217–227.
- [55] Garkani-Nejad Z., Rashidi-Nodeh H.: Comparison of conventional artificial neural network and wavelet neural network in modeling the half-wave potential of aldehydes and ketones. *Electrochimica Acta* **55** (2010), 2597–2605.
- [56] Dai Y., Liu H., Niu L., Chen C., Chen X., Liu Y.: Estimation of half-wave potential of anabolic androgenic steroids by means of QSER approach. *Journal of Central South University* **23** (2016), 1906–1914.

- [57] Shamsipur M., Siroueinejad A., Hemmateenejad B., Abbaspour A., Sharghi H., Alizadeh K., Arshadi S.: Cyclic voltammetric, computational, and quantitative structure–electrochemistry relationship studies of the reduction of several 9,10-anthraquinone derivatives. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **600** (2007), 345–358.
- [58] Nekoei M., Mohammadhosseini M., Alavi Gharahbagh A.: Quantitative structure-electrochemistry relationship (QSER) study for prediction of half-wave reduction potentials of some organic compounds. *Analytical & Bioanalytical Electrochemistry* **1** (2009), 159–168.
- [59] Li H., Xu L., Su Q.: Structure–property relationship between half-wave potentials of organic compounds and their topology. *Analytica Chimica Acta* **316** (1995), 39–45.
- [60] Hemmateenejad B., Shamsipur M.: Quantitative structure–electrochemistry relationship study of some organic compounds using PC-ANN and PCR. *Internet Electronic Journal of Molecular Design* **3** (2004), 316–334.
- [61] Honarasa F., Yousefinejad S., Nasr S., Nekoeini M.: Structure–electrochemistry relationship in non-aqueous solutions: Predicting the reduction potential of anthraquinones derivatives in some organic solvents. *Journal of Molecular Liquids* **212** (2015), 52–57.
- [62] Liu H., Han P., Wen Y., Luan F., Gao Y., Li X.: Quantitative structure-electrochemistry relationship for variously-substituted 9, 10-anthraquinones using both an heuristic method and a radial basis function neural network. *Dyes Pigments* **84** (2010), 148–152.
- [63] Beheshti A., Norouzi P., Ganjali M.R.: A simple and robust model for predicting the reduction potential of quinones family; Electrophilicity index effect. *International Journal of Electrochemical Science* **7** (2012), 4811–4821.
- [64] Hadjmohammadi M.R., Kamel K., Biparva P.: Quantitative structure-reduction potential relationship study of some quinones in five solvents. *Journal of Solution Chemistry* **40** (2011), 224–230.
- [65] Mohammadhossein M., Nekoei M.: Quantitative structure-electrochemistry relationship study for prediction of half-wave reduction potentials of some chlorinated organic compounds by genetic algorithm-multiple linear regression. *Asian Journal of Chemistry* **25** (2013), 349–352.
- [66] Goudarzia N., Goodarzi M., Mohammad Hosseini M., Nekooei M.: QSPR models for prediction of half wave potentials of some chlorinated organic compounds using SR-PLS and GA-PLS methods. *Molecular Physics* **107** (2009), 1739–1744.
- [67] Tian M., Thind S.S., Simko M., Gao F., Chen A.: Quantitative structure–reactivity study of electrochemical oxidation of phenolic compounds at the SnO<sub>2</sub>-based electrode. *The Journal of Physical Chemistry A* **116** (2012), 2927–2934.
- [68] Beheshti A., Riahia S., Ganjali M.R.: Quantitative structure–property relationship study on first reduction and oxidation potentials of donor-substituted phenylquinolinylethyne and phenylisoquinolinylethyne: Quantum chemical investigation. *Electrochimica Acta* **54** (2009), 5368–5375.

- [69] Fatemi M.H., Hadjmohammadi M.R., Kamel K., Biparva P.: Quantitative structure-property relationship prediction of the half-wave potential for substituted nitrobenzenes in five nonaqueous solvents. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **80** (2007), 303–306.
- [70] Noorizadehz H., Farmany A.: Theoretical prediction for the half wave reduction potential of organic molecules. *Russian Journal of Electrochemistry* **50** (2014), 579–586.
- [71] Hemmateenejad B., Yazdania M.: QSPR models for half-wave reduction potential of steroids: A comparative study between feature selection and feature extraction from subsets of or entire set of descriptors. *Analytica Chimica Acta* **634** (2009), 27–35.
- [72] Nikolić S., Miličević A., Trinajstić N.: QSPR study of polarographic half-wave reduction potentials of benzenoid hydrocarbons. *Croatica Chemica Acta* **79** (2006), 155–159.
- [73] Noorizadeh H., Farmany A.: Quantitative structure–electrochemistry relationship for substituted benzenoids using Levenberg–Marquardt artificial neural network. *Russian Journal of Electrochemistry* **51** (2015), 249–257.
- [74] Singh J., Singh S., Meer S., Agrawal V.K., Khadikar P.V., Balaban A.T.: QSPR correlations of half-wave reduction potentials of *cata*-condensed benzenoid hydrocarbons. *Arkivoc* **25** (2006) 104–119.
- [75] Weininger D.: SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *Journal of Chemical Information and Modeling* **28** (1988), 31–36.
- [76] Weininger D., Weininger A., Weininger J.L.: SMILES. 2. Algorithm for generation of unique SMILES notation. *Journal of Chemical Information and Modeling* **29** (1989) 97–101.
- [77] Toropov A.A., Toropova A.P., Benfenati E., Nicolotti O., Carotti A., Nesmerak K., Veselinović A.M., Veselinović J.B., Duchowicz P.R., Bacelo D., Castro E.A., Rasulev B.F., Leszczynska D., Leszczynski J.: QSPR/QSAR analyses by means of the CORAL software: results, challenges, perspectives. In: *Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design, Predictive Toxicology, and Risk Assessment*. K. Roy (Ed.). Hershey, IGI Global 2015, p. 560–585.
- [78] Nesměrák K., Němec I., Štícha M., Waisser K., Palát K.: Quantitative structure-property relationships of new benzoxazines and their electrooxidation as a model of metabolic degradation. *Electrochimica Acta* **50** (2005), 1431–1437.
- [79] Huitao Liu H., Wen Y., Luan F., Gao Y., Li X.: QSPR study for the prediction of half-wave potentials of benzoxazines by heuristic method and radial basis function neural network. *Central European Journal of Chemistry* **7** (2009), 439–445.
- [80] Toropov A., Nesmerak K., Raska I., Waisser K., Palat K.: QSPR modeling of the half-wave potentials of benzoxazines by optimal descriptors calculated with the SMILES. *Computational Biology and Chemistry* **30** (2006), 434–437.
- [81] Nesměrák K., Doležal R., Hudská V., Bártil J., Štícha M., Waisser K.: Quantitative structure–electrochemistry relationship of 1-phenyl-5-benzyl-sulfanyltetrazoles and their electrooxidation as a metabolic model. *Electroanalysis* **22** (2010), 2117–2122..

- [82] Toropov A.A., Nesmerak K.: SMILES-based QSPR model for half-wave potentials of 1-phenyl-5-benzylsulfanyltetrazoles using CORAL. *Chemical Physics Letters* **539–540** (2012), 204–208.
- [83] Nesměrák K., Toropov A.A., Toropova A.P., Kohoutova P., Waisser K.: SMILES-based quantitative structure-property relationships for half-wave potential of N-benzyl-salicylthioamides. *European Journal of Medicinal Chemistry* **63** (2013), 111–114.
- [84] Nesměrák K., Toropov A.A., Toropova A.P.: Model for electrochemical parameters for 4-(benzylsulfanyl)pyridines calculated from the molecular structure. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **766** (2016), 24–29.

## 5 Závěr

Ve své habilitační práci jsem shrnul výsledky mého výzkumu z let 2002 až 2016 týkající se využití elektroanalytických metod při studiu farmak.

V první části práce, věnované průtokové injekční analýze, jsou prezentovány dvě nové modifikace FIA pro stanovení fenothiazinů v léčivých přípravcích. Zavedli jsme FIA titraci v nevodném prostředí s potenciometrickou detekcí, která umožňuje značné zrychlení analýzy za současné eliminace problémů spojených s prací v silně korozivním prostředí bezvodé kyseliny octové. Pro FIA spektrofluorimetrické stanovení založené na oxidaci fenothiazinu jsme vyvinuli elektrochemickou celu vlastní konstrukce; vyvinuté stanovení se vyznačuje rychlostí a nenáročností (nejsou potřeba další reagenty). Obě práce se, podle citačních ohlasů, staly podkladem pro další studie v této oblasti.

Výsledky prezentované v druhé části habilitační práce přispívají k rozvoji použití elektroanalytických metod v predikci metabolického osudu farmak. Pro čtyři skupiny potenciálních farmak byly elektrochemickou oxidací připraveny a následně plně identifikovány možné metabolity, při čemž byly navrženy i možné analogie se známými biotransformačními reakcemi. Námi publikované práce byly citovány v literatuře zabývající se tímto tématem a plně zapadají do trendu v oblasti elektrochemického modelování metabolismu.

Konečně ve třetí části práce jsou demonstrovány možnosti využití elektroanalytických dat v QSAR pro čtyři skupiny potenciálních farmak. Za náš největší přínos, jak je patrné i z citačního ohlasu, lze bezesporu považovat zavedení nového topologického deskriptoru založeného na SMILES. Aplikace tohoto deskriptoru na další (nejen elektroanalytická) data je směrem, jímž by se měl výzkum na tomto poli dále ubírat.

Rád bych svou habilitační prací demonstroval, že elektroanalytická chemie má pro řešení analytických problémů v oblasti farmak velký potenciál, a patří jí proto pevné a nezastupitelné místo ve výuce a výzkumu na akademických pracovištích.

## 6 Přehled publikovaných prací

### 6.1 Kapitoly v knihách

- [1] Novaković J., Nesměrák K.: Sterols/thin-layer (planar) chromatography. In: *Encyclopedia of Separation Science*. I.D. Wilson (Ed.). London, Academic Press 2000. ISBN 0-12-226770-2, p. 4255–4261. DOI: 10.1016/B0-12-226770-2/02971-9
- [2] Pecková K., Nesměrák K.: Electrochemistry of bile acids, cholesterol, and related compounds (An overview). In: *Sensing in Electroanalysis. Vol. 7*. K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytřas (Eds.). Pardubice, University Press Centre 2012. ISBN 978-80-7395-563-2, p. 87–96.
- [3] Nesměrák K.: Ln/An in health and disease. In: *Encyclopedia of Metalloproteins*. R.H. Kretsinger, V.N. Uversky, E.A. Permyakov (Eds.). Springer 2013. ISBN 978-1-4614-1532-9. p. 1098–1103. DOI: 10.1007/978-1-4614-1533-6\_152
- [4] Nesměrák K.: Ln/An toxicity. In: *Encyclopedia of Metalloproteins*. R.H. Kretsinger, V.N. Uversky, E.A. Permyakov (Eds.). Springer 2013. ISBN 978-1-4614-1532-9. p. 1098–1103. DOI: 10.1007/978-1-4614-1533-6\_151
- [5] Toropov A.A., Toropova A.P., Benfenati E., Nicolotti O., Carotti A., Nesmerak K., Veselinović A.M., Veselinović J.B., Duchowicz P.R., Babelo D., Castro E.A., Rasulev B.F., Leszczynska D., Leszczynski J.: QSPR/QSAR analyses by means of the CORAL software: Results, challenges, perspectives. In: *Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design, Predictive Toxicology, and Risk Assessment*. K. Roy (Ed.). Hershey, IGI Global 2015. ISBN 978-1466681361. p. 560–585 DOI: 10.4018/978-1-4666-8136-1.ch015
- [6] Toropov A.A., Toropova A.P., Nesmerak K., Veselinović A.M., Veselinović J.B., Leszczynska D., Leszczynski J.: Development of the latest tools for building up “nano-QSAR”: Quantitative features-property/activity relationships (QFPRs/QFARs). In: *Practical Aspects of Computational Chemistry. Vol. IV*. J. Leszczynski, M.K. Shukla (Eds.). Springer 2016. ISBN 978-1-4899-7699-4, p. 353–396. DOI: 10.1007/978-1-4899-7699-4\_12

## 6.2 Původní vědecké práce v impaktovaných časopisech

- [1] Nesměrák K., Pelouchová H., Všetečka V., Němec I., Gabriel J.: Antifungal effects of new heterocyclic compounds 6*H*-pyrimido[2,1-*a*]isoindole derivatives. *Folia Microbiologica* **43** (1998), 39–41. DOI: 10.1007/BF02815539
- [2] Nesměrák K., Němec I., Štícha M., Gabriel J., Mirceski V.: Electrochemical oxidation of probucol in anhydrous acetonitrile. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **64** (1999), 1100–1110. DOI: 10.1135/cccc19991100
- [3] Němcová I., Nesměrák K., Tománková V.: Určení hodnoty kritické micelární koncentrace Marlophenu NP-10 metodou cyklické voltametrie. *Chemické listy* **94** (2000), 195–196.
- [4] Nesměrák K., Pospíšek M., Němec I., Waisser K., Gabriel J.: Antifungal properties of substituted 1-phenyl-5-mercaptotetrazoles and their oxidation product, 5-bis-(1-phenyl-tetrazolyl)disulfide. *Folia Microbiologica* **45** (2000), 138–142. DOI: 10.1007/BF02817412
- [5] Gabriel J., Shah V., Nesměrák K., Baldrian P., Nerud F.: Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the copper(II)-hydrogen peroxide system. *Folia Microbiologica* **45** (2000), 573–575. DOI: 10.1007/BF02818729
- [6] Tesařová E., Tuzar Z., Nesměrák K., Bosáková Z., Gaš B.: Study on the aggregation of teicoplanin. *Talanta* **54** (2001), 643–653. DOI: 10.1016/S0039-9140(01)00313-7
- [7] Novaković J., Nesměrák K., Nová H., Filka K.: An HPTLC method for the determination and the purity control of ciprofloxacin HCl in coated tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **25** (2001), 957–964. DOI: 10.1016/S0731-7085(01)00387-9
- [8] Němcová I., Nesměrák K., Jelínek I., Němec I., Barbe J.: Characterization of newly synthesized thioacridine derivatives, their voltammetric behaviour and electrophoretic determination. *Analytical Letters* **34** (2001), 1223–1232. DOI: 10.1081/AL-100104967
- [9] Nesměrák K., Pospíšek M., Zikánová B., Němec I., Barbe J., Gabriel J.: Effect of structure on antibiotic action of new 9-(ethylthio)acridines. *Folia Microbiologica* **47** (2002), 118–120. DOI: 10.1007/BF02817668
- [10] Pumera M., Horká V., Nesměrák K.: Non-aqueous capillary electrophoretic separation and detection of 6*H*-pyrimido[2,1-*a*]isoindoles. *Journal of Separation Science* **25** (2002), 443–446. DOI: 10.1002/1615-9314(20020501)25:7<443::AID-JSSC443>3.0.CO;2-7
- [11] Nesmerak K., Nemecek I., Sticha M., Nemcova I., Horka V.: Structure-property relationships of thioacridines; their electrochemical oxidation as a model of metabolic degradation. *Analytical Letters* **35** (2002), 1617–1629. DOI: 10.1081/AL-120013043
- [12] Němcová I., Nesměrák K., Rychlovský P., Koutníková J.: FIA titrations of phenothiazine derivatives in aqueous micellar and non-aqueous media. *Talanta* **65** (2005), 632–637. DOI: 10.1016/j.talanta.2004.07.033



- [13] Nesmerak K., Nemeč I., Sticha M., Waisser K., Palat K.: Quantitative structure-property relationships of new benzoxazines and their electrooxidation as a model of metabolic degradation. *Electrochimica Acta* **50** (2005), 1431–1437. DOI: 10.1016/j.electacta.2004.08.031
- [14] Němcová I., Vondrková V., Nesměrák K.: Ternary complexes of lanthanide-calix[4]arene with sulphophthalein dyes. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **54** (2006), 47–51. DOI: 10.1007/s10847-005-3994-3
- [15] Němcová I., Nesměrák K., Kafková B., Sejbal J.: Physicochemical properties of 9-(alkylsulfanyl)- and 9-(arylsulfanyl)acridine derivatives and their interaction with (2-hydroxypropyl)cyclodextrins *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **71** (2006), 179–189. DOI: 10.1135/-cccc20060179
- [16] Toropov A., Nesmerak K., Raska I., Waisser K., Palat K.: QSPR modeling of the half-wave potentials of benzoxazines by optimal descriptors calculated with the SMILES. *Computational Biology and Chemistry* **30** (2006), 434–437. DOI: 10.1016/j.compbiolchem.2006.09.003
- [17] Pospíchal R., Nesměrák K., Rychlovský P., Němcová I.: Determination of chondroitin sulfate by thiazine dyes using flow injection analysis with spectrophotometric detection. *Analytical Letters* **40** (2007), 1167–1175. DOI: 10.1080/00032710701298560
- [18] Filipi R., Nesměrák K., Rucki M., Roth Z., Hanzlíková I., Tichý M.: Akutní toxicita prvků vzácných zemin a jejich sloučenin. *Chemické listy* **101** (2007), 793–798.
- [19] Nesměrák K., Doležal R., Hudská V., Bártil J., Štícha M., Waisser K.: Quantitative structure-electrochemistry relationship of 1-phenyl-5-benzyl-sulfanyltetrazoles and their electrooxidation as a metabolic model. *Electroanalysis* **22** (2010), 2117–2122. DOI: 10.1002/elan.201000092
- [20] Nesměrák K., Štícha M., Čvančarová M.: HPLC/MS analysis of historical pharmaceutical preparations of heroin and cocaine. *Analytical Letters* **43** (2010), 2572–2581. DOI: 10.1080/0003271100-3725649
- [21] Toropov A.A., Nesmerak K.: SMILES-based QSPR model for half-wave potentials of 1-phenyl-5-benzylsulfanyltetrazoles using CORAL. *Chemical Physics Letters* **539–540** (2012), 204–208. DOI: 10.1016/j.cplett.2012.04.061
- [22] Nesměrák K., Červený V., Hraníček J., Rychlovský P.: A spectrofluorimetric determination of phenothiazine derivatives after their photooxidation or chemical or electrochemical oxidation in a flow injection arrangement. *Microchemical Journal* **106** (2013), 226–232. DOI: 10.1016/j.microc.2012.07.006
- [23] Nesmerak K., Toropov A.A., Toropova A.P., Kohoutova P., Waisser K.: SMILES-based quantitative structure-property relationships for half-wave potential of *N*-benzylsalicylthioamides. *European Journal of Medicinal Chemistry* **63** (2013), 111–114. DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.05.031
- [24] Nesměrák K., Toropov A.A., Toropova A.P.: SMILES-based quantitative structure-retention relationships for RP-HPLC of 1-phenyl-5-benzylsulfanyltetrazoles. *Structural Chemistry* **25** (2014), 311–317. DOI: 10.1007/s11224-013-0293-2

- [25] Toropov A.A., Toropova A.P., Veselinovic A.M., Veselinovic J.B., Nesmerak K., Raska I., Duchowicz P.R., Castro E.A., Kudyshkin V.O., Leszczynska D., Leszczynski J.: The Monte Carlo method based on eclectic data as an efficient tool for predictions of endpoints for nanomaterials – two examples of application. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **18** (2015), 376–386. DOI: 10.2174/1386207318666150305125044
- [26] Nesměrák K., Toropov A.A., Toropova A.P., Yildiz I., Yalcin I., Brozikova M., Klimesova V., Waisser K.: Prediction of retention characteristics of heterocyclic compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **407** (2015), 9185–9189. DOI: 10.1007/s00216-015-9067-6
- [27] Opekar F., Nesměrák K., Tůma P.: Electrokinetic injection of samples into a short electrophoretic capillary controlled by piezoelectric micropumps. *Electrophoresis* **37** (2016), 595–600. DOI: 10.1002/elps.201500464
- [28] Nesměrák K., Toropov A.A., Toropova A.P.: Model for electrochemical parameters for 4-(benzylsulfanyl)pyridines calculated from the molecular structure. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **766** (2016), 24–29. DOI: 10.1016/j.jelechem.2016.01.032
- [29] Mansfeldová V., Klusáčková M., Tarábková H., Janda P., Nesměrák K.: Versatile cell for in-situ spectroelectrochemical and ex-situ nanomorphological characterization of both water soluble and insoluble phthalocyanine compounds. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* **147** (2016), 1393–1400. DOI: 10.1007/s00706-016-1743-5

### 6.3 Přehledové články v impaktovaných časopisech

- [1] Nesměrák K., Němcová I.: Determination of critical micelle concentration by electrochemical means. Mini-review. *Analytical Letters* **39** (2006), 1023–1040. DOI: 10.1080/00032710600620302
- [2] Nesměrák K., Němcová I.: Dating of historical manuscripts using spectrometric methods. A mini-review. *Analytical Letters* **45** (2012), 330–344. DOI: 10.1080/00032719.2011.644741
- [3] Nesměrák K., Třmínková P.: Spectrometric methods for determination of ligand-protein ratio in monoclonal conjugates. A mini review. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* **147** (2016), 1339–1342. DOI: 10.1007/s00706-016-1747-1
- [4] Zlámalová M., Nesměrák K.: Recent advances in electrochemical detection of important sulfhydryl-containing compounds. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* **147** (2016), 1331–1338. DOI: 10.1007/s00706-016-1757-z

## 6.4 Jiné publikace v impaktovaných nebo recenzovaných časopisech

- [1] Nesměrák K.: Historie a perspektivy hmotného průzkumu Rukopisů královédvorského a zelenohorského. *Chemické listy* **107** (2013), 194–201.
- [2] Nesměrák K.: Karla Slavoje Amerlinga „Lučebné zkoumání na suché a mokré cestě“ aneb cesta k počátkům české analytické chemie. *Chemické listy* **107** (2013), 804–814.
- [3] Chalupa R., Nesměrák K.: Chemofobie, veřejný obraz chemie a co s tím? *Chemické listy* **108** (2014), 995–1000.
- [4] Nesměrák K., Kunešová J.: Farmaceutická historie kapucínského kláštera v Praze na Hradčanech. Část I. Klášterní lékárna. *Česká a Slovenská farmacie* **64** (2015), 79–94.
- [5] Nesměrák K., Kunešová J.: Farmaceutická historie kapucínského kláštera v Praze na Hradčanech. Část II. Kapucínský balzám (Balsamum capucinatorum). *Česká a Slovenská farmacie* **64** (2015), 95–99.
- [6] Nesměrák K.: Historie analgetik. (Přehledný článek.) *Bolest* **19** (2016), 21–30.

## Přílohy

- Příloha A NĚmcová I., Nesměrák K., Rychlovský P., Koutníková J.: FIA titrations of phenothiazine derivatives in aqueous micellar and non-aqueous media. *Talanta* **65** (2005), 632–637.
- Příloha B Nesměrák K., Červený V., Hraníček J., Rychlovský P.: A spectrofluorimetric determination of phenothiazine derivatives after their photooxidation or chemical or electrochemical oxidation in a flow injection arrangement. *Microchemical Journal* **106** (2013), 226–232.
- Příloha C Nesmerak K., Nemeč I., Sticha M., NĚmcova I., Horka V.: Structure-property relationships of thioacridines; their electrochemical oxidation as a model of metabolic degradation. *Analytical Letters* **35** (2002), 1617–1629.
- Příloha D Nesmerak K., Nemeč I., Sticha M., Waisser K., Palat K.: Quantitative structure-property relationships of new benzoxazines and their electrooxidation as a model of metabolic degradation. *Electrochimica Acta* **50** (2005), 1431–1437.
- Příloha E Nesměrák K., Doležal R., Hudská V., Bártl J., Štícha M., Waisser K.: Quantitative structure-electrochemistry relationship of 1-phenyl-5-benzyl-sulfanyltetrazoles and their electrooxidation as a metabolic model. *Electroanalysis* **22** (2010), 2117–2122.
- Příloha F Nesměrák K., Toropov A.A., Toropova A.P.: Model for electrochemical parameters for 4-(benzylsulfanyl)pyridines calculated from the molecular structure. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **766** (2016), 24–29.
- Příloha G Toropov A.A., Toropova A.P., Benfenati E., Nicolotti O., Carotti A., Nesmerak K., Veselinović A.M., Veselinović J.B., Duchowicz P.R., Bacelo D., Castro E.A., Rasulev B.F., Leszczynska D., Leszczynski J.: QSPR/QSAR analyses by means of the CORAL software: Results, challenges, perspectives. In: *Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design, Predictive Toxicology, and Risk Assessment*. K. Roy (Ed.). Hershey, IGI Global 2015, p. 560–585
- Příloha H Toropov A., Nesmerak K., Raska I., Waisser K., Palat K.: QSPR modeling of the half-wave potentials of benzoxazines by optimal descriptors calculated with the SMILES. *Computational Biology and Chemistry* **30** (2006), 434–437.
- Příloha CH Toropov A.A., Nesmerak K.: SMILES-based QSPR model for half-wave potentials of 1-phenyl-5-benzylsulfanyltetrazoles using CORAL. *Chemical Physics Letters* **539–540** (2012), 204–208.
- Příloha I Nesmerak K., Toropov A.A., Toropova A.P., Kohoutova P., Waisser K.: SMILES-based quantitative structure-property relationships for half-wave potential of *N*-benzylsalicylthioamides. *European Journal of Medicinal Chemistry* **63** (2013), 111–114.