

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální chemie

Voltametrické chování tolterodinu

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

V Olomouci 2011

Radka Straková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální chemie

Voltametrické chování tolterodinu

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:	Radka Straková
Studijní obor:	Management v chemii
Forma studia:	prezenční
Vedoucí bakalářské práce:	RNDr. Jana Skopalová, PhD

Olomouc 2011

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Vlastnoruční podpis

Děkuji své vedoucí paní RNDr. Janě Skopalové, Ph.D za odborné vedení, cenné rady a informace, které mi poskytla při práci na této bakalářské práci. Dále děkuji všem, kteří mi jakkoli pomohli při tvorbě této bakalářské práce.

Poděkování také patří mým rodičům, kteří mi umožnili studovat na vysoké škole.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Radka Straková
Název práce:	Voltametrické chování tolterodinu
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	RNDr. Skopalová Jana, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2011
Abstrakt:	Cílem této práce bylo studovat elektrochemické chování tolterodinu v závislosti na změně pH za pomoci různých voltametrických technik - cyklická voltametrie a diferenčně pulsní voltametrie.
Klíčová slova:	tolterodin, elektrochemické chování, voltametrie, pH
Počet stran:	39
Počet příloh:	1 x CD
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname:	Radka Straková
Title:	Voltammetric behavior of tolterodine
Department:	Department of Physical Chemistry
Type of thesis:	Bachelor
Supervisor:	RNDr. Skopalová Jana, Ph.D.
The year of presentation:	2011
Abstract:	The aim of my work was to study the behavior of tolterodine by voltammetric techniques, depending on the pH of solution. Electrochemical behavior of tolterodine was monitored by two methods - Differential Pulse Voltammetry (DPV) and Cyclic Voltammetry (CV).
Keywords:	tolterodine, electrochemical behaviour, voltametry, pH
Number of pages:	39
Number of appendices:	1 x CD
Language:	Czech

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1. VLASTNOSTI TOLTERODINU	10
2.1.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti	10
2.1.2. Farmaceutické vlastnosti	10
2.1.2.1. Dávkování	14
2.1.2.2. Interakce	15
2.1.3. Elektrochemické vlastnosti.....	15
2.2. METODY STANOVENÍ TOLTERODINU	15
2.2.1. Kapalinová chromatografie s UV detekcí	15
2.2.2. Kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí.....	15
2.3. VOLTAMETRIE	18
2.3.1. Stejnosměrná voltametrie (DC)	18
2.3.2. Nestacionární voltametrie.....	19
2.3.2.1. Cyklická voltametrie	19
2.3.2.2. Pulsní metody	20
2.3.2.3. Diferenčně pulsní polarografie a voltametrie	20
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	22
3.2. POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY	22
3.2.1. Elektrody	23
3.2.1.1. Pracovní elektrody.....	23
3.2.1.2. Referentní elektrody	23
3.2.1.3. Pomocné elektrody	23
3.2.2. Nastavení přístroje	24
3.2.2.1. CV - Cyklická voltametrie	24
3.2.2.2. DPV - Diferenčně pulsní voltametrie	24
3.3. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	25
3.3.1. Standardní roztok tolterodinu	25
3.3.2. Britton-Robinsonův pufr	25
3.3.3. Příprava roztoků pro voltametrická měření	27
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	28
4.1. OXIDACE TOLTERODINU NA ELEKTRODĚ ZE SKELNÉHO UHLÍKU .	28
4.1.1. Cyklická voltametrie – závislost na rychlosti scanu.....	28
4.1.2. Cyklická voltametrie - závislost na pH	30
4.1.3. Diferenčně pulsní voltametrie	31

4.2. REDUKCE TOLTERODINU NA PRACOVNÍ RŤUTOVÉ KAPKOVÉ ELEKTRODĚ	32
5. ZÁVĚR	33
6. SUMMARY	34
7. SLOVNÍČEK lékařských pojmů^[23]	35
8. LITERATURA	38

1. ÚVOD

Současná společnost je čím dál tím více zatížena nemocemi, které mají výrazně negativní dopad na kvalitu života obyvatel - pacientů. Mezi ty nejznámější je možno zařadit alergická onemocnění různého typu, deprese, zlomeniny, cukrovka, infekce močových cest nebo různé dysfunkce dolních močových cest. Mezi velký soubor příznaků, již zmíněných dysfunkcí dolních močových cest, patří tzv. symptom hyperaktivního močového měchýře (overactive bladder, OAB).

Podle vědeckých studií je na léčbu OAB nejefektivnější aplikace anticholinergních látek^[1]. Jsou známy dvě skupiny anticholinergních látek - neselektivní a selektivní anticholinergní látky. Z chemického hlediska se jedná o substituované aminy, kde jeden nebo více atomů vodíku byl nahrazen alkylovou nebo arylovou skupinou. Aminosloučeniny jsou děleny na primární, sekundární a terciární aminy a kvartérní amoniové sloučeniny. Terciární aminosloučeniny (TAS) se vyznačují svým výrazným lipofilním charakterem, mají vyšší biologickou dostupnost než kvartérní amoniové sloučeniny, ale zároveň snadněji pronikají hematoencefalickou bariérou. Mezi již zmíněnými TAS můžeme nalézt: oxybutynin, tolterodin, darifenacin, solifenacin a propiverin^[1].

Oxybutynin je součástí a hlavní účinnou látkou léku dostupného pod komerčním názvem Ditropan. Tolterodin je dostupný ve dvou variantách, Detrol nebo Detrol LA^[1].

Neselektivní anticholinergní látky (NAL) dosahují své nejvyšší účinnosti vazbou antimuskarinových látek na muskarinové receptory, tak zablokuje aktivitu acetylcholinu a sníží aktivitu detruzoru^[1]. Oxybutanin, tolterodin, trospium chlorid a solifenancin spadají mezi (NAL). Vědci došli k závěrům, že tolterodine a oxybutanin se váží stejně na muskarinové receptory v močovém měchýři, ale také že oxybutanin má mnohem vyšší afinitu k receptorům ve slinných žlázách^[1].

Bylo zjištěno že, anticholinergní látky vykazují po perorálním podání u pacientů vedlejší účinky. Mezi nejčastější patří sucho v ústech a poruchy akomodace^[1].

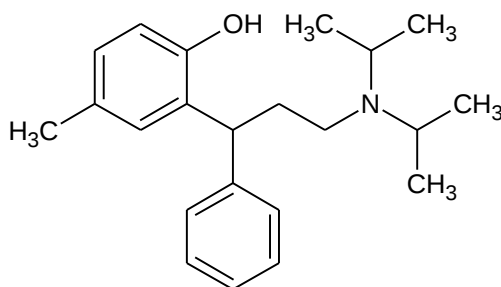
Cílem této práce bylo studovat elektrochemické chování tolterodinu v závislosti na změně pH za pomoci různých voltametrických technik - cyklická voltametrie a diferenčně pulsní voltametrie. Jako pracovní elektroda je použita elektroda ze skelného uhlíku.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. VLASTNOSTI TOLTERODINU

2.1.1. Fyzikálně-chemické vlastnosti

Toletrodin (Obr. 1) je bílý krystalický prášek rozpustný ve vodě (12 g/l při pokojové teplotě). Dále je rozpustný v methanolu, méně ochotně se rozpouští v ethanolu a prakticky nerozpustný je v toluenu^[2]. Molární hmotnost odpovídá 325,488 g/mol a disociační konstanta pK_a je rovna 9,9^[2]. Celý chemický název účinné látky je (R)-2-[3-(diisopropylamino)-1-fenylpropyl]-4-methylfenol. Sumární vzorec tolterodinu je $C_{22}H_{31}NO$. Ve farmaceutických přípravcích se používá tolterodin hydrogentartrát^[4]. Jeho bod tání se pohybuje v rozmezí teplot 206 °C až 212 °C^[7]. Rozdělovací poměr (Log D) v systému *n*-oktanol/voda je 1,83 při pH 7,3^[3]. V České Republice je dostupný pod obchodními názvy Detrol, Detrusitol a Detrusitol SR^[5,6]. Klasický Detrusitol je indikován pacientům dvakrát denně, Detrusitol SR, tzv. slow release, pacienti užívají pouze jedenkrát denně^[5,6]. Lék se musí uchovávat při pokojové teplotě v dobře uzavřené nádobě^[2].



Obr.1: Strukturní vzorec tolterodinu

2.1.2. Farmaceutické vlastnosti

Farmakologická léčba urgentní inkontinence byla po dlouhou dobu založena na antagonistech muskarinových receptorů. Mezi nejznámější a nejdůležitější můžeme zahrnout propanthiline, emepronium nebo oxybutanin, ale také především tolterodin. V současnosti je oxybutanin považován za účinný lék na léčbu močového měchýře. Léčba je účinná, ale často

vedou vedlejší účinky k diskontinuální léčbě. Proto se přistoupilo ke studiu tolterodinu. Mezi nejčastější vedlejší účinky oxybutaninu zahrnujeme sucho v ústech, které se objevuje cca u 50% pacientů^[7].

Tolterodin představuje nového silného a konkurence schopného selektivního antagonistu muskarinových receptorů^[8]. Speciálně byl vyvíjen pro léčbu urgentní inkontinence a dalších příznaků spojených s hyperaktivním močovým měchýřem (OAB)^[9]. V současné době je tolterodin hlavní oporou farmakoterapie pro OAB^[10].

OAB představuje převládající a stresující syndrom charakterizovaný nucením obvykle doprovázený zvýšenou denní frekvencí a nykturií. Mezinárodní společnost definuje nykturii jako buzení k vyprazdňování jedenkrát nebo vícekrát za noc^[11]. Za normálních podmínek dochází k močení z důvodu fyziologické potřeby sekundárního močového měchýře^[11]. Může tak ovlivňovat kvalitu života, celkovou pohodu, zdravotní i duševní, vitalitu, produktivitu a vnímání zdraví, především v důsledku narušení spánku^[11]. Pro společnost představuje OAB převládající, nákladné zatížení, podobně jako například deprese, infekce močových cest nebo zlomeniny^[10,12]. Dokonce se předpokládá, že do budoucna se situace bude zhoršovat. Ve skutečnosti může tento dopad na společnost být horší než například cukrovka^[12]. Studie v USA zaznamenali, že cca 33 milionů dospělých jedinců, 16,0 % mužů a 16,9 % žen trpí OAB^[5,10]. Podobné studie byly prováděny i v Evropě. Bylo zjištěno, že 16,6 % dospělých, zahrnující 15,6 % mužů a 17,4 % žen, trpí příznaky OAB^[10]. Vědci prokázali, že prevalence se zvyšuje s věkem a pravděpodobnost výskytu naléhavosti a močové inkontinence též^[5,10]. Prevalence OAB v Evropě byla odhadnuta na 3,4 % a 8,7 % mezi 40 - 44 rokem, 18,9 % a 16,9 % ve věku 60 - 64 let a 41,9 % a 31,3 % u pacientů starších 75 let. Prevalence OAB je podobná u mužů (16 %) jako u žen (17 %), ale ženy mohou mít větší zkušenosti se symptomy v mladším věku, a je větší pravděpodobnost zasažení inkontinencí (UII)^[12]. Podle dosavadních studií, více mužů trpí naléhavostí a větší frekvencí. U žen má větší procentuální zastoupení inkontinence^[12]. Je dokázáno, že muži a ženy mají odlišný postoj na hledání alternativní léčby OAB, v nárocích na výsledky léčby, v přesvědčení o etiologii, ale také v dopadu potíží na odbornou činnost^[12]. Vědci věří, že tolterodin pracuje na snížení mimovolné kontrakce detruzoru a že zlepší symptomy OAB. Studie vykazují pozitivní účinky zejména u starších lidí, ale problémem je špatná snášenlivost farmaceutických agens, která je spojena s vyšším rizikem vedlejších účinků. Z tohoto důvodu se začala zkoumat snášenlivost tolterodinu prodlouženým uvolňováním u pacientů ve věku 65 - 74 let a starších 75 let

s problémy OAB. Byla použita data z pěti velkých klinických placebo kontrol^[10]. Testovalo se pomocí randomizované studie po dobu 3 měsíců, vzorky byly dvojité zaslepené. Vedlejší účinky při dávkách 4 mg/den byly stejné s dávkou oxybutaninu (3 mg 3 krát denně) a dokonce srovnatelné s placebem^[4]. Data byla rozdělena do věkových skupin a vyhodnotila se podle výskytu nežádoucích účinků. Četnost přerušení léčby byla vyšší u skupiny pacientů starších 75 let než u skupiny mladší 65 let. Výsledky byly shodné jak pro tolterodin s prodlouženým uvolňováním tak pro placebo. Sucho v ústech byl jediný nežádoucí účinek spojený s léčbou tolterodinu s prodlouženým uvolňováním^[10]. Po léčbě tolterodinem s prodlouženým uvolňováním se snížil celkový průměr onemocnění a těžké močení v průběhu 24 hodin v porovnání s placebem^[12]. Léčba placebem měla pozitivní výsledky jen v případě snížení vážného OAB u mužů^[12]. Mezi další terapeutické indikace tolterodinu patří OAB s projevy urgentní mikce až urgentní inkontinence, smíšená inkontinence a v určitých případech je lék využíván jako doplňkový lék při léčbě iritačních příznaků u benigní hyperplazie prostaty^[5].

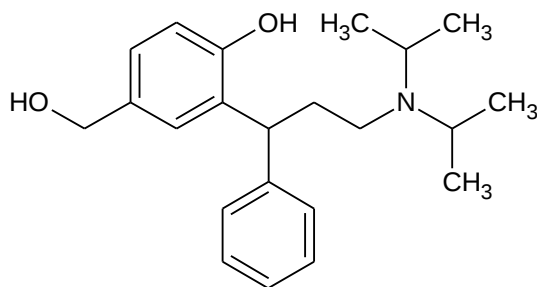
Jako antagonist má vyšší specifitu pro M₂- receptor ve fázi klinického vývoje, ale nižší afinitu k receptoru M₃- s přímou korelací na jeden z nežádoucích účinků, sucho v ústech^[8].

Muskarinové receptory jsou široce distribuovány v těle a rozlišuje se 5 podtypů známých jako M₁ - M₅. Muskarinový receptor M₁- převládá v neuronálních tkáních^[7,10]. Podtyp M₁- má výraznou afinitu na slinné žlázy, kortex nebo hippocampus a ovlivňuje funkce centrální nervové soustavy (CNS)^[5]. Hladké svalstvo lidského těla obsahuje smíšenou populaci podtypů muskarinových receptorů M₂- a M₃-^[5]. Srdeční sval obsahuje převážně homogenní populaci M₂- receptoru, který je predominantní cholinoreceptor přítomný v močovém měchýři^[7,10]. M₃- receptor je funkčně důležitější, protože zprostředkovává přímou kontrakci detruzoru a je obsažen v exokrinních žlázách^[7,13]. M₄- je dominantní na bazální ganglia a nalezneme jej ve striatumu, kortexu a periferní ledvině^[7,10]. M₅- vykazuje vysokou afinitu na střední mozek, oči a substantia nigra. M₅- ovlivňuje vizus a akomodaci^[5].

Při požití léku byly zjištěny vedlejší účinky typu alergické reakce, včetně otoků, zrychlený srdeční puls nebo poruchy srdečního rytmu, hromadění tekutiny v rukou, nohou, halucinace, parestezie, bolest na hrudi, hypertenze, poruchy vidění, xerophthalmia, dysurie, dyspepsie, vyrážka, svědění, zánět průdušek, kašel, zánět hltanu nebo také infekce horních cest dýchacích^[2].

Tolterodin se váže na bílkoviny, plazmatické proteiny, zejména na α_1 – glykoprotein, a po perorálním podání je rychle a rozsáhle metabolizován v játrech, obvykle během 1 až 2 hodin^[5]. Perorální podávání tolterodinu je často závislé na dávce a od té se odvíjejí již zmíněné nežádoucí vedlejší účinky. Mezi nejčastější spadají sucho v ústech, tachykardie, závratě a gastrointestinální obstrukční poruchy^[14].

Metabolické dráhy tolterodinu jsou zprostředkovány v první řadě jaterním cytochromem P4502D6^[8]. Metabolizace probíhá pomocí dvou cest^[9]. První metabolická cesta zahrnuje oxidaci 5-methylové skupiny, zprostředkovanou již výše zmíněným cytochromem^[8,9]. Oxidace dále vede k farmakologicky účinnému 5-hydroxymethyl metabolitu, DD01 (Obr. 2), což je nejaktivnější metabolit tolterodinu^[5,8,9]. Následuje přeměna na aldehyd a metabolit 5-karboxylové kyseliny^[9]. Při druhé metabolické cestě dochází k dealkylaci dusíku, tolterodin a metabolit jsou konjugovány s kyselinou glukuronovou^[9]. DD01 má podobný farmakologický profil jako tolterodin^[8]. Plazmatické koncentrace tolterodinu a DD01 závisí na metabolické schopnosti zkoumaných jednotlivců^[8]. Poškození jater může mít významný vliv na farmakokinetiku tolterodinu, proto pacienti s významně sníženou funkcí jater nedostávají dávky léku větší než 1 mg/2x denně^[8]. Podobně jsou na tom pacienti se sníženou funkcí ledvin, kteří by neměli obdržet více než 2 mg/1x denně^[6]. Indikace u pacientů s cirhózou jater je omezená, stejně jako u pacientů postižených silnou nauzeou^[14]. Z tohoto důvodu se předpokládá, že transdermální trasa tolterodinu by mohla být alternativní trasou pro tyto pacienty^[14]. Minimalizují se gastrointestiniální poruchy, zvyšuje se spokojenost pacientů, je udržována konstantní hladina účinné látky v krevní plazmě^[14]. Tato alternativní cesta umožňuje kdykoli a kdekoli přerušit nebo dokonce zastavit rozběhlou léčbu^[14].



Obr.2: Strukturní vzorec 5-hydroxymethyl tolterodinu

Tolterodin má anticholinergní a přímý spasmolytický účinek na hladký sval močového měchýře^[14]. Snižuje tlak detrusoru močového měchýře, u nemocných s poruchou evakuace moči může dokonce vést až k vzniku postmikčního rezidua^[5].

Tolterodin je vylučován především močí a výkaly^[9]. Z podávaného množství se 77 % metabolitů vyloučí do moči a 17 % ve stolici při normální dávce^[5,9]. Méně jak 1 % se vyloučí ve stejné, nezměněné formě a 5-14 % se objeví ve formě 5-hydroxymethylových derivátů^[5].

U mužského i ženského pohlaví je biologický poločas eliminace tolterodinu 1,9 - 3,7 hodin^[5]. Poločas 5-HM je u žen roven 3 hodinám a u mužů odpovídá 3,3 hodiny^[5].

2.1.2.1. Dávkování

Detrol, Detrusitol a Detrusitol SR jsou dostupné ve formě kapslí s prodlouženým uvolňováním (2 mg, 4 mg) nebo tablet (1 mg, 2 mg)^[6]. U kapslí se doporučuje rozžvýkání nebo rozdrcení^[6].

Tolterodin je užíván dospělými v perorální dávce 2 mg u okamžitého dávkování^[5,6]. Tato dávka se může snížit na 1 mg v závislosti na odpovědi a toleranci^[5,6]. Druhá varianta je dávka 4 mg pro prodloužené uvolňování jedenkrát denně a je možnost snížení podle okolností na dávku 2 mg jedenkrát denně^[6]. U klasické formy je podává dvakrát denně, u SR varianty jednou denně ráno^[5]. U SR formy je udáván nižší výskyt nežádoucích účinků a o 18 % vyšší účinnost^[5].

Předávkování tolterodinem se vyznačuje velkým anticholinergním účinkem na entrylní nervový systém. Takto postižení jedinci se musí léčit^[5].

Mezi kontraindikace zahrnujeme retenci moči, obtížně léčitelný glaukom s úzkým úhlem, myastheria gravis a jiné. Dokonce i gravidita spadá mezi kontraindikace^[5]. Dávkování se upravuje v případě poruch funkce jater, poruch funkce ledvin a při současném užívání silných inhibitorů CYP3A4^[6].

Podání jednotlivé dávky tolterodinu 6,4 mg zdravým jedincům vede k výraznému zvýšení reziduálního objemu v močovém měchýři a výrazně snižuje maximální tlak detrusoru. Tento účinek je patrný za jednu i pět hodin po podání^[5]. Analogický účinek můžeme očekávat i při nižších dávkách, jejichž podání je spojeno s podstatně menší pravděpodobností parasymptolytiky mimo močový měchýř, projevující se zejména sníženou tvorbou slin a suchem v ústech^[5].

2.1.2.2. Interakce

Claritomycin, erythromycin, intracorazol, ketoconazol, miconazol a další inhibitory cytochrom P450 3A4 zpomalují metabolismus tolterodinu. Proto mohou zvyšovat hladiny tolterodinu v plasmě, což může zvýšit jeho účinnost i vedlejší účinky^[6].

Potraviny zvyšují biologickou dostupnost léku s okamžitým uvolňováním, ale nemají vliv na lék s prodlouženým uvolňováním^[6].

2.1.3. Elektrochemické vlastnosti

V literatuře doposud nebyly popsány elektrochemické vlastnosti tolterodinu.

2.2. METODY STANOVENÍ TOLTERODINU

2.2.1. Kapalinová chromatografie s UV detekcí

Vědci vyvinuli a validovali novou metodu na stanovení složek obsažených v tolterodinu vinanu za použití kapalinové chromatografie (LC). Použili chromatografickou kolonu typu Zorbax SB C-8 (150 mm x 4,6 mm s velikostí částic 3,5 µm). Mobilní fáze obsahovala směs pufru a acetonitrilu v poměru 60:40 (v/v). Puffer obsahoval 50 mM monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 5 ml triethylaminu ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$) pH se upravilo na hodnotu 2,5 za použití kyseliny fosforečné (H_3PO_4) - zředěné vodou v objemovém poměru 1:10. Průtok MF - 0,8 ml/min. Teplota kolony byla udržována na 27 °C. Dávkoval se objem 10 µl. Za použití spektrofotometrické detekce v ultrafialové oblasti při 210 nm se provedla kvantifikace. Rozlišení mezi tolterodinem a jeho třemi potenciálními nečistotami bylo větší než 2.0. Metoda byla úspěšně použita pro stanovení tolterodinu vinanu ve farmaceutických přípravcích^[15].

2.2.2. Kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí

Tato selektivní, citlivá a vysoce výkonná metoda byla vyvinuta a validována pro stanovení tolterodinu a jeho aktivního metabolitu, 5-hydroxymethyltolterodinu, v lidské plazmě.

Extrakce a přečištění účinné látky, metabolitu a jejich vnitřních standardů z 300 μ l lidské plazmy bylo provedeno v systému kapalina - kapalina směsí dichlormethan : isopropanol : *n*-hexan (40:5:55, v/v/v). Oba analyty byly chromatograficky odděleny na Shimadzu LC systému s kolonou Symetrie C₁₈ (100 mm x 4,6 mm; 5 μ m - velikost částic) za použití mobilní fáze připravené z 10 mM mravenčanu amonného (HCOONH₄ - pH 5,0) a acetonitrilu v poměru 5:65 (v/v) s faktorem rozlišení 2,72^[16].

Pro stanovení nízkých koncentrací volného tolterodinu a jeho metabolitu 5-HM v lidské plazmě byl využit kapilární přepínací systém. Nízké koncentrace obou analytů z plazmy se získaly ultrafiltrací. Krevní plasma, jejíž pH bylo upraveno přidavkem tris pufru na hodnotu 7,4, byla obohacena standardními roztoky tolterodinu a 5-HM připravenými ve stejném pufru. Byly použity dvě koncentrace analytů v plasmě: 100 pmol/l a 100 nmol/l. Objemy 40-400 μ l plazmy s přidanými analyty byly při 37 °C ultrafiltrovány v předehřáté odstředivce cca 10-20 min. Další přečištění vzorku bylo provedeno on-line v křemenné kapilární předkoloně naplněné reverzní fází C₁₈. Chromatografický systém obsahoval dvě LC čerpadla (pro naplnění před-kolony rozpouštědlem a k čerpání mobilní fáze pro separaci na koloně) a dále šesticestný ventil se smyčkami o objemu 2,5 nebo 10 μ l. Vzorek se vpravil na před-kolonu za pomoci mravenčanového pufru (pH 3,4) a methanolu, v poměru 90:10 (v/v) s průtokovou rychlostí 30 μ l/min. K separaci analytů byla použita kapilární kolona z taveného křemene dlouhá 20-25 cm s vnitřním průměrem 200 μ m, plněná částicemi C₁₈ o velikosti 5 μ m. Mobilní fází byla směs mravenčanového pufru (pH 3,4) s methanolem (40:60, v/v). Detekce analytů byla provedena v hmotnostním spektrometru s trojitým kvadrupólem s využitím ionizace elektrosprejem^[17].

Metoda založená na HPLC - MS s ESI (ionizace elektrosprejem) byla vyvinuta pro stanovení tolterodinu vinanu v lidské plazmě. Jako vnitřní standard byl použit oxybutynin. Tolterodin byl vyextrahován z plazmy pomocí *n*-hexanu a isopropanolu v poměru 95:5 (v/v). Organická vrstva se odpaří a zbytek se rozpustí v mobilní fázi (MF), složené z acetonitrilu a vodného roztoku (10 mM CH₃COONH₄, pH 3,0), 50:50 (v/v). Průtok MF byl nastaven na 0,2 ml/min. Chromatograficky analyzováno bylo 10 μ l vzorku za použití Shimadzu LC-10AD HPLC systému s automatickým dávkovačem vzorku. Byla použita kolona typu Shim-pack VP-ODS C₁₈ (150 mm x 2.0 mm I.D.). Separace na koloně se provedla při teplotě

40 °C. Jako detektor byl použit kvadrupólový hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem. Detekční limit byl 0,05 ng/ml ^[18].

Isokratická chirální HPLC metoda byla vyvinuta pro separaci enantiomerů tolterodinu. Metoda je validovaná, reprodukovatelná a citlivá. MF je složená z *n*-hexanu a isopropyl alkoholu v poměru 980:20 (v/v) s 1 ml diethylaminu a 0,6 ml CF₃COOH. Analýza byla provedena při konstantní pokojové teplotě na koloně typu Chiralcel OD-H (250 mm x 4,6 mm). Průtok byl udržován na 0,5 ml/min. Touto metodou je možné detekovat až 0,1 µg/ml S-isomeru ^[19].

Další postup vyvinutý pro stanovení tolterodinu a jeho metabolitu 5-HM v plasmě metodou HPLC/MS-MS využívá extrakce sloučenin z plazmy do *t*-butylmethyletheru. HPLC separace byla provedena na koloně s oxidem křemičitým (30 mm x 4,6 mm, 3 µl velikost částic). Mobilní fáze obsahovala acetonitril a octan amonný v poměru 70:30 (v/v), průtok byl 0,6 ml/min, teplota kolony 45 °C. Detekce analytů se provedla technikou ionizace elektrosprejem s tandemovým hmotnostním spektrometrem ^[20].

SPE systém byl spojen s MS a použit pro rychlou kvantifikaci volného tolterodinu a jeho metabolitu v plasmě. Ultrafiltrací plazmy se získaly volné frakce látek a ultrafiltrát byl aplikován na SPE kapiláru (4 mm x 200 µm I.D.) naplněnou C₁₈ fází. Použila se dvě HPLC čerpadla, jedno k dávkování vzorku ve směsi methanol – mravenčanový pufr pH 3,4 (10:90, v/v). Druhé čerpadlo sloužilo k eluci analytu směsí methanolu s, kyselinou mravenčí (70:30, v/v). Na detekci byl použit hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupolem. Iontovým zdrojem byl elektrosprej. Kalibrační křivky byly lineární v rozmezí 0,05 až 1000 ng/ml, detekční limit byl 50 pg/ml. Doba potřebná k SPE-MS analýze jednoho vzorku nepřekračovala 6 minut ^[21].

2.3. VOLTAMETRIE

Voltametrie, spolu s polarografií, jsou metody, při kterých se sleduje závislost proudu procházejícího pracovní elektrodou ponořenou v analyzovaném roztoku na potenciálu, který se na tuto elektrodu vkládá z vnějšího zdroje. Závislost je vyjádřena polarizační křivkou a velikost proudu, procházejícího za přítomnosti analytu při vhodném potenciálu, je analytickým signálem. Závislost proudu na elektrodovém potenciálu lze měřit v ustáleném (stacionárním) stavu nebo za dynamických (nestacionárních) podmínek^[22].

Ke vzniku širokého spektra voltametrických metod vedly výzkumy J. Heyrovského, týkající se elektrolýzy se rtuťovou kapkovou elektrodou. Tyto výzkumy vedl ke vzniku polarografie v roce 1922. Polarografie patřila k nejdůležitějším v analytické chemii až do konce padesátých let. Byla oceněna Nobelovou cenou za chemii v roce 1959, udělenou již zmíněnému J. Heyrovskému. Postupem času byly polarografické metody v útlumu díky jiným instrumentálním metodám, především spektroskopickým. Obnovení zájmu o polarografii se dostavilo s rozvojem elektroniky v sedmdesátých letech minulého století. To umožnilo výrobu spolehlivých a levných přístrojů pro techniky se superponovaným střídavým napětím^[22].

V současné době se klasická stacionární polarografie a voltametrie v praktické analýze uplatňuje málokdy. Navzdory tomu představuje velmi důležitý teoretický základ pro analytickou aplikaci pulsních technik^[22].

K nejcitlivějším analytickým metodám patří metody elektrochemické rozpouštěcí analýzy. Používají různé sdružování polarografických i voltametrických metod, stacionárních a nestacionárních, s předběžným nahromaděním analyzované látky na pracovní elektrodě^[22].

2.3.1. Stejnosměrná voltametrie (DC)

Potenciál vkládaný na pracovní elektrodu se lineárně mění s časem, buď roste nebo klesá. Změna rychlosti potenciálu je dostatečně malá v porovnání s rychlostí ustavováním rovnováhy u elektrod. Z tohoto důvodu je možno metodu považovat za stacionární při konstantním potenciálu^[22].

Závislost potenciálu vkládaného na pracovní elektrodu se nazývá potenciálový program. Proudová odezva, představuje závislost měřeného proudu procházejícího pracovní elektrodou na vkládaném potenciálu. Potenciálová osa je i osou časovou^[22].

Pokud se v analyzovaném roztoku u pracovní elektrody nenachází látka, která by se redukovala či oxidovala, nemůže se uskutečnit elektrodová reakce a elektroda vystupuje jako zpolarizovaná. Touto elektrodou prochází pouze nabíjecí (kapacitní) proud^[22].

Když je u elektrody látka, která má schopnost se při určitém potenciálu oxidovat nebo redukovat, dochází k depolarizaci elektrody. Elektrodou poté prochází i elektrolytický (faradaický) proud. Mírou koncentrace depolarizátoru je odpovídající velikost anodického či katodického proudu. Mezi nejsledovanější depolarizátory spadá stanovovaná látka, analyt^[22].

2.3.2. Nestacionární voltametrie

Měřená veličina, u nestacionárních elektroanalytických metod, je funkcí času. Při popisu je nutné uvažovat čtyři závisle proměnné veličiny, mezi které patří: potenciál, proud, koncentrace a čas. Během měření se vždy jedna veličina kontroluje a sleduje se závislost druhé veličiny na čase. Metody se dělí podle kontrolované veličiny na potenciostatické metody a metody galvanostatické. Potenciál je kontrolován u potenciostatických metod a galvanostatické metody kontrolují proud. Ve voltametrických metodách je měřenou veličinou proud a jeho velikost je řízena nestacionárním transportem, kontrolovanou veličinou je potenciál. Tvar nestacionárních voltametrických křivek je zapříčiněn časovou závislostí koncentračního gradientu, který se mění s tloušťkou difúzní vrstvy. Měření vyžaduje zpravidla časovou synchronizaci mezi vkládáním potenciálu na elektrodu a měřením proudu^[22].

2.3.2.1. Cyklická voltametrie

Nestacionární metoda, při které se na elektrodu v nemíchaném roztoku vkládá potenciál trojúhelníkového průběhu s rychlostí změny dE/dt . Polarizační křivky mají tvar píku. Proud píku je závislý na rychlosti časové změny potenciálu^[22].

Přímé využití je velice malé, ale hlavní význam představuje při studiu elektrodových reakcí. Z průběhu katodických a anodických křivek je možné usuzovat na mechanismus elektrodové reakce, posuzovat reverzibilitu či ireverzibilitu. Pro reverzibilní děje platí:

(1) rozdíl potenciálů anodického a katodického píku $E_{p,a} - E_{p,k} = 0,059/n$

(2) podíl proudů anodického a katodického píku: $I_{p,a} / I_{p,k} = 1$

(3) potenciál píku je nezávislý na rychlosti změny potenciálu, dE/dt , a je o $28,5/n$ mV negativnější - u katodického, či pozitivnější - u anodického píku než půlvolný potenciál^[22].

Pro ireverzibilní děj, rozdíl potenciálů anodického a katodického píku závisí na rychlosti polarizace, dE/dt , a také na hodnotách α a k^0 , které charakterizují elektrodovou reakci. Z těchto závislostí lze uvedené parametry určit. U dějů řízených difúzí platí přímá úměra mezi výškou píku a odmocninou z rychlosti polarizace, $(dE/dt)^{1/2}$. U dějů kontrolovaných adsorpcí platí přímá úměra mezi výškou píku a rychlostí polarizace, dE/dt .
[22]

2.3.2.2. Pulsní metody

Je známo několik modifikací pulsní voltametrie, které se liší způsobem a tvarem potenciálových pulsů vkládaných na elektrodu. Proud se měří pouze po určité, přesně definované době. Voltamogramy jsou tvořeny více nebo méně hustými „schůdky“, dle rychlosti vzorkování a rychlosti změny potenciálu proto, že paměť přístroje uchovává změřený proud vzorku do doby dalšího vzorkování. Pulsní metody jsou přesnější a úspěšnější na rtuťových elektrodách ve srovnání s elektrodami z tuhého materiálu^[22].

Hlavním zdrojem šumu, v metodách ve kterých se mění potenciál, je kapacitní proud^[22].

2.3.2.3. Diferenčně pulsní polarografie a voltametrie

Diferenčně pulsní polarografie (DPP) a diferenčně pulsní voltametrie (DPV) v současnosti představují nejvýznamnější pulsní metody pro praktickou analytickou chemii. Na potenciál, který se lineárně mění s časem, je vkládán napěťový puls o amplitudě 10 - 100 mV a době trvání odpovídající řádově desítkám milisekund. U DPP je na každou kapku vložen vždy jeden puls těsně před koncem doby jejího trvání, podobně je tomu i u normální pulsní polarografie (NPP). Zaznamenává se rozdíl proudů změřených těsně před vložením pulsu a na jeho konci. Závislost rozdílu proudů na potenciálu prochází maximem a má tvar píku. Poloha píku na potenciálové ose je dána kvalitou analytu a výška píku je závislá na koncentraci analytu. Výška píku roste s rostoucí amplitudou vkládaného pulsu, a zároveň se

pík rozšiřuje, což způsobuje zhoršení selektivity stanovení. Toto pravidlo plyne z teorie DPP a v praxi je důležité se rozhodnout, jestli je pro nás důležitější selektivita nebo citlivost^[22].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

- **Tolterodin hydrogenvínan** , p.a- $C_{22}H_{31}NO$, $M_r = 475,6$ g/mol, skladován při 4 °C
- **redestilovaná voda** (ze systému Milipore, specifický odpor $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$)
- **kyselina trihydrogenfosforečná**, p.a - H_3PO_4 (85%)
Lachema, s. p., Brno závod Neratovice Chemapol,
- **kyselina octová**, p.a - CH_3COOH (99%)
Lach-Ner, s.r.o.
- **kyselina trihydrogenboritá**, p.a - H_3BO_3
Lachema, n.p. Brno, závod Neratovice Chemapol, ČSN 685008
- **chloristan sodný monohydrát**, p.a - $NaClO_4 \cdot H_2O$
Fluka
- **hydroxid sodný**, p.a - $NaOH$
Lach-Ner, s.r.o
- **kyselina šťavelová monohydrát**, p.a - $(COOH)_2 \cdot H_2O$
Uherský Brod, Ing. Petr Lukeš
- **chlorid vápenatý**, p.a - $CaCl_2$ (20%)
Lach-ner, Neratovice
- **methyllčerveň**, p.a - 0,1% ethanolický roztok, sodná sůl
 $C_{15}H_{14}N_3NaO_2$

3.2. POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- Voltametrická měření - v modech FSDPV a CV byl použit Eco-Tribo-Polarograf (Polaro-Sensors, Praha).

- pH-metr - na přípravu série tlumivých roztoků (pufrů) a zpětné ověření a přeměření pH vzorků byl použit pH metr inoLab 720 s kombinovanou elektrodou SenTix 21 (WTW, Německo)

3.2.1. Elektrody

Pro všechna voltametrická měření bylo použito tříelektrodové zapojení - pracovní elektroda, referentní elektroda a pomocná elektroda.

3.2.1.1. Pracovní elektrody

- Elektroda ze skelného uhlíku - disk o průměru 3,0 mm; Bioanalytical Systems, USA. Před každým měřením byla leštěna za pomoci vodné emulze aluminy (Al_2O_3 , 0,05 μm , Aldrich) nanesené na mikrovláknovou textilií (Buehler, USA) a sonikován v destilované vodě ultrazvukem po dobu 30 s.
- Rtuťová kapková elektroda (Polaro-Sensors, Praha) byla použita ve statickém modu (SMDE)

3.2.1.2. Referentní elektrody

- Argentchloridová elektroda - Ag/AgCl v 1M-KCl (Monokrystaly, Turnov)
- Kalomelová elektroda – Hg/Hg₂Cl₂ v nasyceném roztoku KCl (Monokrystaly, Turnov)

3.2.1.3. Pomocné elektrody

- Platinová elektroda - platinový drátek (Elektrochemické Detektory, Ohrazenice)

3.2.2. Nastavení přístroje

K vyhodnocení všech voltametrických měření byl použit počítačový program Polar 4.

3.2.2.1. CV - Cyklická voltametrie

Pro voltametrická měření za pomoci cyklické voltametrie byly prostřednictvím počítačového programu Polar 4 nastaveny příslušné parametry uvedené v tabulce 1.

Tab. 1: Nastavení parametrů měření cyklickou voltametrií

parametr	jednotka	nastavení
počáteční (mV)	mV	-200
konečný (mV)	mV	1200
rychlost (mV/s)	mV/s	50
doba bublání	s	600
potenciál čištění	mV	0
doba čištění	s	0
počet cyklů		2

3.2.2.2. DPV - Diferenčně pulsní voltametrie

Pro voltametrická měření za pomoci diferenčně pulsní voltametrie byly prostřednictvím počítačového programu Polar 4 nastaveny příslušné parametry uvedené v tabulce 2.

Tab. 2: Nastavení parametrů pro měření diferenčně pulsní voltametrií

parametr	jednotka	nastavení
počáteční	mV	0
konečný	mV	1200
rychlost	mV/s	20
doba bublání	s	600

počet scanů		1
potenciál čištění	mV	0
doba čištění	s	1
klidová doba	s	5
výška pulsu	mV	50
šířka pulsu	ms	80

3.3. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

3.3.1. Standardní roztok tolterodinu

Zásobní roztok tolterodinu s koncentrací $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ jsem připravila do 10 ml odměrné baňky rozpuštěním navážky 4,8 mg práškového tolterodinu hydrogenvínanu v 10 ml redestilované vody. Roztok byl skladován při teplotě 4 C.

3.3.2. Britton-Robinsonův pufr

Základní roztok Britton-Robinsonova pufru jsem připravila z kyseliny trihydrogenborité (2,4732 g H_3BO_3), kyseliny octové (2,31 ml 99 % CH_3COOH) a kyseliny trihydrogenfosforečné (2,70 ml 85 % H_3PO_4) v 1 litru redestilované vody.

Zásobní roztok hydroxidu sodného koncentrace 0,2 mol/l v objemu 250 ml jsem připravila zředěním 50% roztoku NaOH (5,246 ml) redestilovanou vodou. Molární koncentrace zásobního roztoku hydroxidu jsem ověřila titrací s kyselinou šťavelovu podle následujícího postupu:

Do 100 ml kádinky jsem odměřila přesně 2 ml roztoku kyseliny šťavelové koncentrace 0,3490 mol/l, přidala 5 ml 20% roztoku CaCl_2 a 0,5 ml indikátoru methylové oranže. Do roztoku jsem ponořila skleněnou kombinovanou pH-elektrodu a přidala redestilovanou vodu (asi 20 ml) tak, aby elektroda byla ponořena. Za neustálého míchání na elektromagnetické míchače jsem titrovala zásobním roztokem NaOH po 0,1 ml a zaznamenávala odpovídající hodnoty pH. Titraci jsem opakovala celkem třikrát. Spotřebu NaOH v bodě ekvivalence jsem vyhodnotila z druhých diferencí pH podle objemu (vzorec 1).

$$V_x = V^+ + \Delta V \frac{\Delta^2 \text{pH}^+}{\Delta^2 \text{pH}^+ + \Delta^2 \text{pH}^-} \quad (1)$$

kde V_x je hledaný objem činidla, V^+ – objem činidla odpovídající poslední kladné druhé diferenci pH, ΔV – konstantní přídavek činidla, $\Delta^2 \text{pH}^+$ a $\Delta^2 \text{pH}^-$ – poslední kladná a první záporná druhá difference pH. Koncentrace zásobního roztoku NaOH určená jako průměr ze tří titrací byla 0,18 mol/l.

Zásobní roztok chloristanu sodného koncentrace 1 mol/l pro úpravu iontové síly jsem připravila v objemu 50 ml ze 7,023 g $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a redestilované vody.

Ze základních roztoků jsem připravila sérii tlumivých roztoků smícháním 20 ml základního Britton-Robinsonova pufru s roztoky 0,2M-NaOH a 1M- NaClO_4 v objemech uvedených v tabulce 3.

Tab.3: Roztoky Britton-Robinsonových pufrů^[24]. Objemy 0,2M-NaOH a 1M- NaClO_4 přidané k 20 ml základního roztoku na přípravu roztoku o požadované hodnotě pH a iontové síle 0,15

pH	V (0,2M-NaOH) (ml)	V (1M- NaClO_4) (ml)
1,81	0	2,7
1,98	1	2,73
2,21	2	2,77
2,56	3	2,78
3,29	4	2,78
4,1	5	2,75
4,56	6	2,7
5,02	7	2,65
5,72	8	2,55
6,37	9	2,35
6,8	10	2,1
7,24	11	1,86
7,96	12	1,66
8,69	13	1,58
9,15	14	1,5
9,62	15	1,44
10,38	16	1,37
11,2	17	1,07
11,82	19	0,55

3.3.3. Příprava roztoků pro voltametrická měření

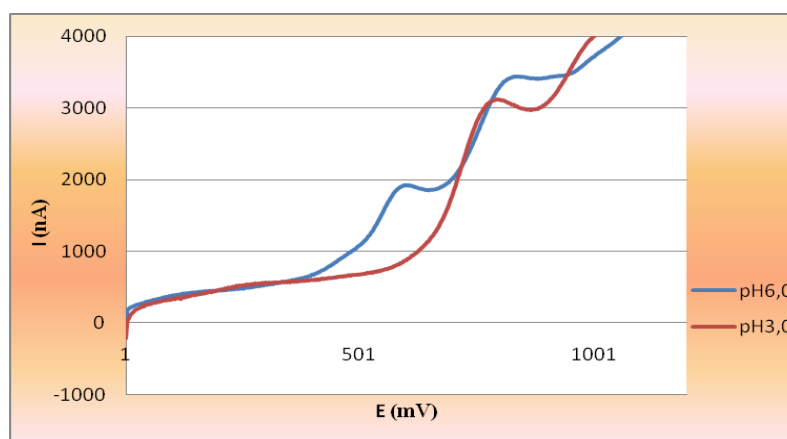
Do voltametrické nádoby o objemu 5 ml jsem odměřila 250 μl roztoku Britton-Robinsonova pufru, 50 μl zásobního roztoku tolterodinu a 200 μl destilované vody. Výsledná koncentrace tolterodinu v nádobce byla $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. OXIDACE TOLTERODINU NA ELEKTRODĚ ZE SKELNÉHO UHLÍKU

4.1.1. Cyklická voltametrie – závislost na rychlosti scanu

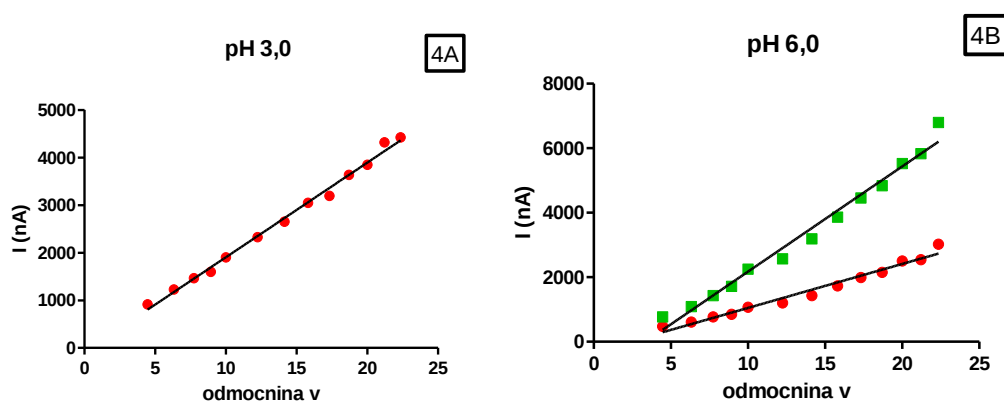
Elektrochemická oxidace tolterodinu byla testována na pracovní elektrodě ze skelného uhlíku ve vodném prostředí o různých hodnotách pH. Obr. 3 ukazuje cyklické voltamogramy tolterodinu v prostředí Britton-Robinsonova pufru o pH 3,0 a 6,0. V anodickém směru polarizace se tolterodin projevuje dvěma píky s potenciály kolem 0,8 a 1,0 V proti Ag/AgCl (1M-KCl) při pH 3,0 a potenciály 0,6 a 0,85 V při pH 6,0. V opačném směru polarizace nebyly pozorovány žádné proudové signály. To znamená, že oxidace probíhá jako ireverzibilní děj.



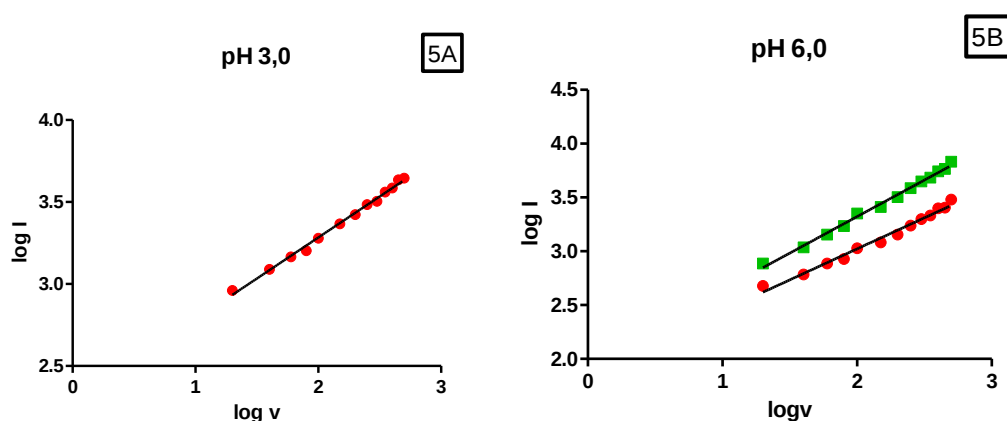
Obr. 3: Cyklický voltamogram tolterodinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) v Britton-Robinsonově pufru o pH 3,2 (červená křivka) a pH 6,0 (modrá křivka) na elektrodě ze skelného uhlíku, rychlost scanu 150 mV/s

Cyklické voltamogramy byly zaznamenány pro různé rychlosti polarizace elektrody v rozmezí 20 až 500 mV/s ve dvou prostředích o různé aciditě: pH 3,0 a pH 6,0. S rostoucí rychlostí narůstaly proudy obou anodických píků. Závislost proudu na odmocnině z rychlosti scanu je v kyselém prostředí (pH 3,2) lineární (Obr. 4A). V méně kyselém roztoku (pH 6,0) se u prvního píku závislost proudu na odmocnině z rychlosti scanu mírně zakřivuje (Obr. 4B). Závislost logaritmu proudu píku na logaritmu rychlosti scanu je lineární se směrnici 0,50 pro

pík I_{p1} v prostředí o pH 3,0 (Obr. 5A) a se směrnicemi 0,68 pro pík I_{p1} a 0,58 pro pík I_{p2} v prostředí o pH 6,0 (Obr. 5B). Proud druhého píku (I_{p2}) byl v kyselém prostředí obtížně vyhodnotitelný, proto zde není zmíněna jeho závislost na rychlosti scanu. Z uvedených závislostí vyplývá, že v kyselém prostředí je transport látky k elektrodě řízený hlavně difúzí, kdežto v méně kyselém se projevuje především u prvního píku také vliv adsorpce tolterodinu na povrch elektrody.



Obr. 4. Závislost proudu píku I_{p1} na odmocnině rychlosti scanu pro prostředí o pH 3,0 (4A) a závislost proudu píku I_{p1} (■) a I_{p2} (●) na odmocnině rychlosti scanu pro prostředí o pH 6,0 (4B).



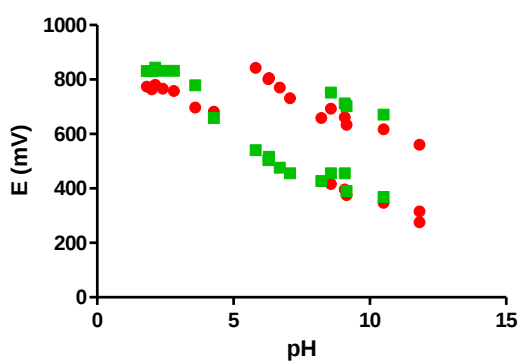
Obr. 5: Závislost logaritmu proudu píků tolterodinu I_{p1} a na logaritmu rychlosti scanu pro prostředí o pH 3,0 (5A) a závislost logaritmu proudu píku I_{p1} (■) a I_{p2} (●) na logaritmu rychlosti scanu pro prostředí o pH 6,0 (5B)

4.1.2. Cyklická voltametrie - závislost na pH

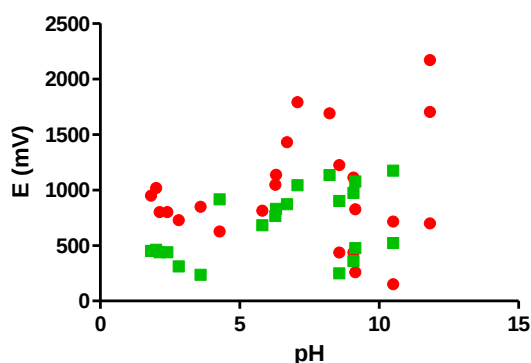
Z Obr. 3 je patrné, že potenciály oxidace toletrodinu závisí na pH roztoku. Tato závislost byla podrobně sledována metodami cyklické voltametrie a diferenčně pulsní voltametrie v sérii Britton-Robinsonových pufrů s hodnotami pH v rozmezí pH 1,8 až 11,8.

Obr. 6 ukazuje, že potenciály obou anodických píků se posunují s rostoucím pH roztoku k nižším hodnotám.

Obr. 7 ukazuje, že proud prvního píku dosahuje nejvyšších hodnot při pH 7,4. Proudů obou anodických píků tolterodinu budou nejnižší v oblasti o pH 8,6.



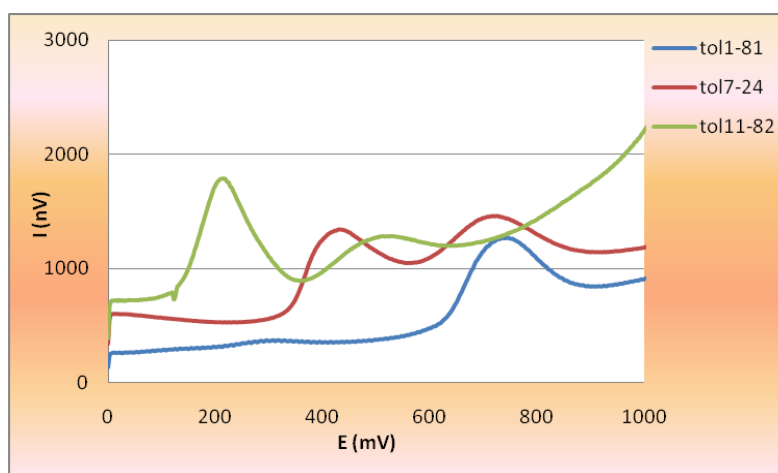
Obr. 6: Závislost potenciálů píků I_{p1} (●) a I_{p2} (■) tolterodinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na pH v Britton-Robinsonových pufrách, rychlost polarizace 50 mV/s.



Obr. 7: Závislost proudů píků I_{p1} (●) a I_{p2} (■) tolterodinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na pH v Britton-Robinsonových pufrách

4.1.3. Diferenčně pulsní voltametrie

Pro sledování oxidace tolterodinu na uhlíkové elektrodě byla použita také metoda diferenčně pulsní voltametrie. Na obr. 8 jsou vidět voltamogramy tolterodinu zaznamenané v kyselém, neutrálním a alkalickém prostředí. V kyselém prostředí poskytuje tolterodin jeden anodický pík s potenciálem kolem 7 V (při pH 1,8). V neutrálním roztoku jsou na záznamu vidět dva téměř stejně vysoké píky s potenciály 0,4 a 0,7 V (při pH 7,2). V alkalických roztocích jeden pík s potenciálem kolem 0,2 V (při pH 11,8).

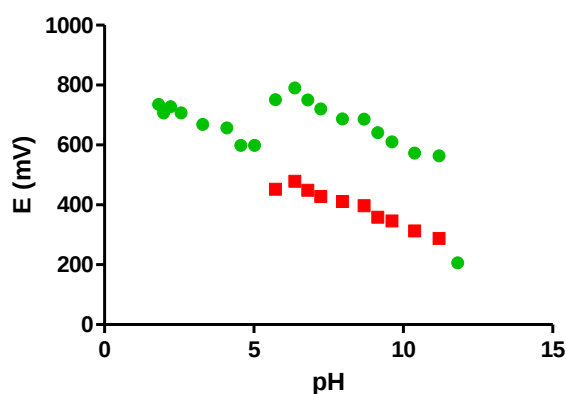


Obr. 8: Diferenčně pulsní voltamogramy tolterodinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na elektrodě ze skelného uhlíku v Britton-Robinsonových pufrech o pH 1,8 (zelená křivka), pH 7,2 (červená křivka) a pH 11,8 (modrá křivka).

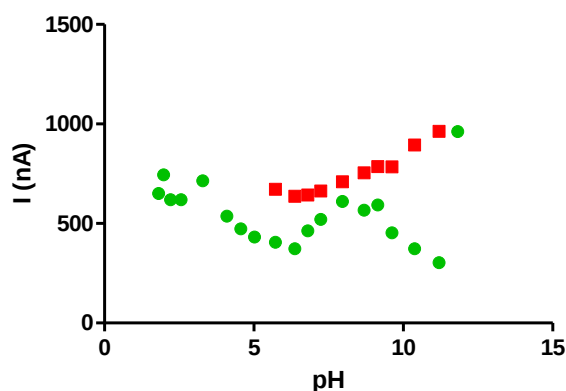
Parametry metody: výška pulsu 50 mV, šířka pulsu 80 ms, rychlost scanu 20 mV/s.

Závislost potenciálu a proudu píků byla sledována také diferenční pulsní metodou. Obr. 9 ukazuje, že potenciály obou anodických píků se posunují s rostoucím pH roztoku k nižším hodnotám.

Z obr. 10 lze usoudit, že tolterodin má nejvyšší odezvu obou anodických proudů píků v prostředí o pH 7,9 (I_{p1} je 611 nA a I_{p2} je 710 nA).



Obr. 9.: Závislost potenciálů píků tolterodinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na pH v Britton-Robinsonových pufrích, první pík (●), druhý pík (■)



Obr. 10.: Závislost proudu DPV- píků tolterodinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na pH v Britton-Robinsonových pufrích; první pík (●), druhý pík (■)

4.2. REDUKCE TOLTERODINU NA PRACOVNÍ RŤUTOVÉ KAPKOVÉ ELEKTRODĚ

Kromě oxidace byla testována také elektrochemická redukce tolterodinu. K tomu byla použita statická rtuťová kapková elektroda (SMDE). Na cyklických voltamogramech zaznamenaných v roztoku Britton-Robinsonova pufru pH 3,2 s koncentrací tolterodinu $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ nebyl pozorován žádný proudový pík. To znamená, že tolterodin je za těchto podmínek neredukovatelný. Toto zjištění je v souladu s chemickou strukturou tolterodinu, která neobsahuje žádné redukovatelné funkční skupiny.

5. ZÁVĚR

Elektrochemické chování tolterodinu bylo sledováno dvěma metodami - diferenčně pulsní voltametrií (DPV) a cyklickou voltametrií (CV). Anodická oxidace tolterodinu na elektrodě ze skelného uhlíku probíhá v celém studovaném rozsahu pH 1,8 až 11,8. V kyselém, neutrálním i alkalickém prostředí byly pozorovány dva píky odpovídající postupné oxidaci. Bylo prokázáno, že elektrodový děj je ireverzibilní a je řízen převážně difúzí látky k povrchu elektrody. Lze očekávat, že k oxidaci dochází na 5-methylové skupině za tvorby 5-HM derivátu, která může probíhat dále za vzniku karbonylové příp. karboxylové skupiny, podobně jako to bylo popsáno při metabolických přeměnách tolterodinu (viz kap. 2.1.2).

Elektrochemická redukce tolterodinu na pracovní rtuťové kapkové elektrodě nebyla zaznamenána, což je v souladu s chemickou strukturou tolterodinu, která neobsahuje žádné redukovatelné funkční skupiny.

6. SUMMARY

Today's society is increasingly burdened by diseases that have a significantly negative impact on quality of life of inhabitants - patients. Among the most important can be included the different types of allergic disorders, depression, fractures, diabetes, urinary tract infections or a variety of lower urinary tract dysfunction. Among a large set of symptoms of mentioned dysfunction of lower urinary tract symptoms belongs so called overactive bladder (OAB).

According to scientific studies, the best way of the treatment of OAB, the application of anticholinergic drugs is the most effective, especially tolterodine. It represents a new strong and a competitive selective antagonist of muscarinic receptors. It is a white crystalline powder soluble in methanol, less readily in ethanol and toluene. It metabolizes to the pharmacologically active 5-hydroxymethyl metabolite. Tolterodine is excreted in the urine (17%) and feces (77%). Tolterodine is known under the commercial name Detrol, and Detrusitol or Detrusitol SR.

Until now, tolterodine has undergone research and testing using analytical methods or has been tested on animals – dogs or rats. Analysis by liquid chromatography (LC) has been successfully validated for the determination of tolterodine tartrate in pharmaceutical substances and medicinal products. LC-MS/MS and HPLC was developed and validated for the determination of tolterodine and its active metabolite, 5-hydroxymethyltolterodine, in human plasma. LC-MS was used for determining low concentrations of unbound tolterodine and 5-HM in human plasma. For the separation of enantiomers of tolterodine was developed an isocratic chiral HPLC. System SPE - MS was used to quantify free tolterodine and its metabolite in plasma.

The aim of my work was to study the behavior of tolterodine by voltammetric techniques, depending on the pH of solution. Electrochemical behavior of tolterodine was monitored by two methods - Differential Pulse Voltammetry (DPV) and Cyclic Voltammetry (CV). Oxidation of tolterodine on the glassy carbon electrode is an irreversible process. Two anodic peaks were observed in a wide region of pH 1,8 to 11,8. The electrode process was driven mainly by diffusion to the surface of glassy carbon electrode.

No voltammetric response was observed in cathodic potential region at the working mercury drop implying tolterodine inactivity towards electrochemical reduction.

7. SLOVNÍČEK lékařských pojmů^[23]

Nykturie - časté močení v noci, mnohdy spojené s menším močením během dne.

Prevalence - počet existujících nemocí či zdravotních problémů ve vybrané populaci k určitému datu.

Etiologie - nauka o příčinách nemoci, příčina nemoci, je známa zejména u většiny infekčních nemocí, naopak u mnoha onemocněních příčina není známa, jsou známy faktory vedoucí ke vzniku nemoci či tento vznik podporují.

Detruzor - sval v močovém měchýři podílející se na jeho vyprazdňování

Placebo - inertní lék či léčebná procedura, obvykle látka, která vypadá jako studovaný lék, ale neobsahuje účinnou složku. V kontrolovaném pokusu bývá placebo podáváno kontrolní skupině osob. Pacient však musí pocítit úlevu, jestliže placebo věří.

Hyperplazie prostaty - nezhoubné onemocnění (zvětšení v důsledku zvýšení počtu jeho buněk) předstojné žlázy, časté u starších mužů, BHP.

Kortex - (cortex) - kůra (určitého orgánu - mozku, ledvin, nadledvin aj. ...).

Hippocampus - obloučkový závit ve spodní části mozku, součást - limbického systému, poetický název „roh Ammonův“.

Exokrinní žlázy - žlázy se zevní sekrecí, které mají vývod ústící na povrch těla nebo do dutého orgánu (střevo, dutiny ústní aj...).

Bazální ganglia - jádra šedé hmoty v mozku ve spodní části telencefala obklopené bílou hmotou, patří k extrapyramidovému systému a podílejí se na koordinaci pohybů.

Striatum - (corpus striatum) část bazálních ganglií zahrnující ncl. candatus a ncl. leatiformis, je součástí extrapyramidového systému.

Substantia nigra - jádro v mezencefalu, mezi erus celebri a tegmentem. Název souvisí s patrnou? melaninovou pigmentací, má spoje s bazálními gangliemi.

Vizus - zraková ostrost, schopnost rozlišit dva velmi blízko ležící body.

Parestezie - porucha čítí projevující se jako brnění, mravenčení, svrbění apod. vzniká při některých poškozeních nervů.

Hypertense - vysoký krevní tlak.

Xerophthalmia - vysychání spojivky a rohovky oka, které může vést k jejich těžkému poškození.

Dysurie - obtížné nebo bolestivé močení, provázené pálením a řezáním, příznak zánětu močových cest, popř. pohlavních orgánů.

Dyspepsie - souhrnné označení pro řadu trávicích obtíží, které se vyskytují v různé kombinaci a mohou mít mnoho příčin.

Tachykardie - zrychlená srdeční frekvence (nad 90/min).

Gastrointestinální obstrukční poruchy - týkající se žaludku a střeva, většinou ve významu trávicí; překážka, zamezení či ztížení průchodnosti dutým orgánem.

Nauzea - nevolnost, pocit na zvracení.

Postmikční reziduum - moč, která zůstává v močovém měchýři po dokončení močení.

Glaukom - zelený zákal, onemocnění charakterizované zvýšeným nitroočním tlakem, následnými změnami vnitřních částí oka a poškozením zrakového nervu, které vede k poruchám vidění.

Mystheria gravis - jde o autoimunitní onemocnění postihující nervosvalový přenos. Jeho příčinou je blokáda nebo zničení acetylcholinových receptorů protilátkami, které se převážně

tvoří v brzlíku. Jde o onemocnění dost vážné, u kterého je velmi důležité dodržování životosprávy, spolupráce s lékaři, správné užívání léků.

Parasympatolytika - léky tlumící činnost parasympatického systému(acetylcholinu) kompetitivním blokováním jeho účinku na muskarinových receptorech.

8. LITERATURA

1. <http://www.remédia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Anticholinergni-latky-v-lecbe-hyperaktivniho-mocoveho-mechyre/6-F-hm.magarticle.aspx>, staženo 9.5.2011.
2. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2004/21228se8-006_detrol_lbl.pdf, staženo 9.5.2011.
3. http://www.rxlist.com/detrol_la-drug.htm, staženo 7.4.2011
4. Nanaki S., Karavas E., Kalantzi L., Bikiaris D.: CARBOHYD POLYM 79, (2010) 1157.
5. Verner P.: Tolterodin, Profil léčiv - Farmakoterapie, Urologická klinika. UK 2. LF a NF v Motole, Praha.
6. <http://www.drugs.com/ppa/tolterodine-tartrate.html>, staženo 28. 2. 2011.
7. Nilvebrant L., Andersson K. E., Gillberg P. G., Stahl M., Sparf B.: EUR J PHARMACOL 327, 195 (1997).
8. Sun F., Sui Ch., Teng L., Liu X., Teng L., Meng Q., Li Y.: INT J PHARM 397, 44 (2010).
9. Andersson S. H. G., Lindgren A., Postlind H.: DRUG METAB DISPOS 98, 528 (1998),.
10. Griebing T. L., Kraus S. R., Richter H. E., Glasser D. B., Carlsson M.: INT J CLIN PRACT 63, 8, 1198 (2009),.
11. Rackley R., Weiss J. P., Rovner E. S., Wang J. T., Guan Z., on behalf of the 037 Study group, UROLOGY 67, 731 (2006).
12. Dmochowski R., Abrams P., Marschall-Kehler D., Wang J. T., Guan Z.: EUR UROL 51, 1054 (2007).
13. Kaur K., Aeron S., Bruhaspathy M., Shetty S. J., Gupta S., Hegde L. H., Silamkoti A. D. V., Metha A., Chugh A., Gupta J. B., Sarma P. K. S., Kumar N.: BIOORG MED CHEM LETT 15, 2093 (2005).
14. Zhao L., Li Y., Fang L., He Z., Liu X., Wang L., Xu Y., Ren Ch.: INT J PHARM 734, 73 (2009).
15. Madhavi A., Reddy G.S., Suryanarayana M. V., Naidu A.: CHROMATOGRAPHIA 68, 399 (2008),.
16. Yadav M., Upadhyay V., Chauhan V., Solanki G., Jani A., Baxi G. A., Singhal P., Shrivastav P.S.: CHROMATOGRAPHIA 72, 255 (2010).
17. Swart R., Koivisto P., Markides K. E.: J CHROMATOGR A 828, 209 (1998).
18. Zhang B., Zhang Z., Tian Y., Yu F.: J CHROMATOGR B 824, 92 (2005).

19. Kumar Y. R., Ramula G., Vevakanand V. V., Vaidyanathan V., Srinivas K., Kumar M. K., Mukkanti K., Reddy M. S., Venkatraman S., Suryanarayana M. V.: J PHARMACEUT BIOMED 35, 1279 (2004).
20. Macek J., Ptáček P., Klíma J.: J CHROMATOGR B 877, 968 (2009).
21. Swart R., Koivisto P., Markides K.E.: J CHROMATOGR B 736, 247 (1999).
22. Barek J., Opekar F., Štulík K.: *Elektroanalytická chemie*, str. 73 - 112. Karolinum, Praha 2005.
23. Vokurka M., Hugo J. a kolektiv (Eds): *Velký lékařský slovník*, 5. vydání, MAXDORF s.r.o., Praha 4.
24. Sýkora V.: *Chemickoanalytické tabulky*. SNTL, Praha 1976.