

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

**Katedra analytické chemie**

---

STANOVENÍ AMINOGLUTETHIMIDU POMOCÍ  
UHLÍKOVÝCH PASTOVÝCH ELEKTROD

Bakalářská práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a výzkumného centra LC06035.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele doc. RNDr. Jiřího Zimy, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 24. května 2008

.....  
Podpis

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc. za odborné vedení, trpělivost a ochotu a dalším členům katedry analytické chemie.

Současně bych chtěla poděkovat rodičům za jejich důvěru a podporu při studiu.

Karolína Vlachová

## OBSAH

Seznam použitých symbolů a zkratk.....	5
<b>1. Teoretická část.....</b>	<b>6</b>
1.1 Cíl práce.....	6
1.2 Farmakologické účinky AGT.....	6
1.3 Metody stanovení AGT.....	7
1.4 Uhlíková pastová elektroda.....	9
<b>2. Experimentální část.....</b>	<b>11</b>
2.1 Chemikálie.....	11
2.2 Aparatura.....	12
2.3 Postup.....	12
<b>3. Výsledky a diskuze.....</b>	<b>13</b>
3.1 Sledování stálosti roztoku AGT.....	13
3.2 Vliv pH na voltametrické chování AGT.....	14
3.3 Kalibrační závislost.....	16
3.4 Studium akumulace AGT na CPE.....	19
3.5 Cyklická voltametrie AGT.....	20
<b>4. Shrnutí.....</b>	<b>27</b>
<b>5. Literatura.....</b>	<b>28</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AGT	aminoglutethimid
BR pufr	Brittonův – Robinsonův pufr
CAS number	registrační číslo
CPE	uhlíková pastová elektroda
CV	cyklická voltametrie
DPV	diferenční pulzní voltametrie
$E_p$	potenciál píku
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
$I_p$	proud píku
$I_{ca}$	proud katodického píku v cyklickém voltamogramu
$I_{pa}$	proud anodického píku v cyklickém voltamogramu
$M_r$	molekulová hmotnost
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
RP-LC	kapalinová chromatografie na reverzních fázích
SFC	superkritická fluidní chromatografie
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
Spfm	spektrofotometrické stanovení
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 CÍL PRÁCE

Tato práce se zabývá studiem elektrochemického chování aminoglutethimidu (AGT) metodou diferenční pulzní voltametrie (DPV) a cyklické voltametrie (CV).

Cílem této práce je nalezení optimálních podmínek pro voltametrické stanovení aminoglutethimidu na uhlíkové pastové elektrodě (CPE).

## 1.2 FARMAKOLOGICKÉ ÚČINKY AGT

AGT inhibuje enzym aromatázu, vyskytující se v ovariích, mozku, tukové tkáni, svalech, játrech, v prsní tkáni a v buňkách zhoubných nádorů prsu, která přeměňuje androgeny na estrogény. Hlavní zdroj estrogenu jsou u premenopauzálních žen ovaria a u žen po menopauze tuková tkáň. Snížením jejich koncentrace v těle dochází k regresi karcinomu<sup>1</sup>. AGT patří k tzv. první generaci nesteroidních inhibitorů aromatázy, klinicky je využíván už od 80. let<sup>2</sup>.

Protože byly inhibovány i enzymy zajišťující produkci steroidů v nadledvinách, musely být pacientkám dodávány současně glykokortikoidy. Kromě toho se při léčbě objevovaly další nežádoucí účinky jako letargie, nevolnost, vyrážka nebo zvýšená teplota. V odborné literatuře byla publikována celá řada studií, zabývajících se odstraněním nežádoucích účinků, zvýšením specifity a účinnosti léku. Např. terapie kombinující AGT a Tamoxifen<sup>3</sup>, léčba *R*-enantiomerem AGT, pro který byla zjištěna asi 20x vyšší účinnost než u *L*-enantiomeru<sup>2</sup> a méně nežádoucích účinků<sup>4</sup>.

V současné době se k léčbě používají inhibitory třetí generace, např. letrozol a anastrozol, které jsou selektivnější a účinnější<sup>1</sup>.

### 1. 3 METODY STANOVENÍ AGT

AGT je využíván jako léčivo, řada klinických studií se zaměřuje především na stanovení látky popř. jejích metabolitů z organismu - z plazmy a moči. V jiných experimentech jsou používány tablety nebo čistá látka. Některé studie se zabývají separací enantiomerů, když bylo zjištěno, že účinnost *R*-enantiomeru AGT je vyšší než účinnost racemátu.

Nejčastěji používanou metodou stanovení AGT je kapalinová chromatografie (LC), dále např. spektrofotometrie nebo plynová chromatografie (GC), pro separaci enantiomerů jsou to různé chromatografické metody (HPLC<sup>5</sup>, SFC<sup>5</sup>, TLC<sup>6</sup>) nebo kapilární elektroforéza (CE<sup>7</sup>). V tabulce I jsou blíže popsány některé v literatuře popsané metody stanovení AGT.

**Tabulka I** Metody stanovení AGT

Metoda	Vzorek	Kolona	Mobilní fáze	Detekce	Mez detekce
LC-RP <sup>8</sup>	čistá látka	Silikagel (15 cm x 3,9 mm)	metanol:acetátový pufr (23:73 v/v) pH 5,0	spfm 240 nm	
LC-RP <sup>9</sup>	plazma	ODS Hypersil, vel. částic 3 μm	11% acetonitril: mravenčánový pufr pH 3,5	spfm 242 nm	0,1 μg.ml <sup>-1</sup>
RP-HPLC <sup>10</sup>	plazma	oktadecyl C <sub>18</sub> (10 cm x 8 mm, vel. částic 10 μm)	<i>tert</i> -butylamoniumfosfát:acetonitril: voda (3:100:100 v/v/v) pH 6,3	spfm 240/254 nm	méně než 1 μmol.l <sup>-1</sup>
RP-HPLC <sup>11</sup>	plazma	Nucleosil C <sub>18</sub> (10 cm x 4,8 mm, vel. částic 5 μm)	acetonitril:metanol:voda (5:20:75 v/v/v)	spfm 235 nm	0,02 μg.g <sup>-1</sup>
RP-HPLC <sup>12</sup>	moč	Spherisorb ODS (30 cm x 4 mm, vel. částic 5 μm)	acetonitril: fosfátový pufr (22:68 v/v) pH 6,8	spfm 234 nm	0,2 μg.ml <sup>-1</sup>
RP-HPLC <sup>13</sup>	tableta	Chiralcel OD (25 cm x 4,6 mm, vel. částic 10 μm)	ethanol:cyklohexan:metanol (95:5:2 v/v/v)	derivatizace fluorescenční λ <sub>ex</sub> 360 nm λ <sub>em</sub> 530 nm	20 ng. ml <sup>-1</sup>
GLC <sup>14</sup>	plazma	2% cyklohexandimethanol sukcinát na Chromosorbu W (150 cm x 0,4 mm)	dusík		0,1 μg.ml <sup>-1</sup>
GC-MS <sup>15</sup>	Moč	HP 5MS (24 m x 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μm)	helium		
Spfm <sup>16</sup>	tableta			Derivatizace Spfm 273 nm, 368 nm, 558 nm	27,3 ng. ml <sup>-1</sup> 10,6 ng. ml <sup>-1</sup> 9,3 ng. ml <sup>-1</sup>



## 1.4 UHLÍKOVÁ PASTOVÁ ELEKTRODA

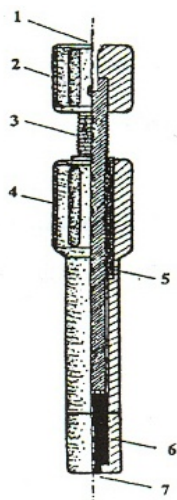
Uhlíková pastová elektroda (Carbon Paste Electrode, CPE) byla poprvé představena R. N. Adamsem v roce 1958. Jeho původním záměrem bylo vytvoření tzv. kapající uhlíkové elektrody, jako analog ke kapkové rtuťové elektrodě, pomocí které by bylo možno měřit anodické oxidace směsí organických látek, pro které rtuťovou kapkovou elektrodu nelze použít. Kapající uhlíková elektroda se v praxi neosvědčila, ale hustá směs práškového uhlíku a kapaliny - uhlíková pasta, představovala elektrodový materiál se zajímavými vlastnostmi<sup>17</sup>. Ty jsou výrazně ovlivněny pastovou kapalinou, kterou můžeme zvolit podle stanovovaného analytu. Nejčastěji jsou používány parafinové oleje - Nujol, Uvasol a silikonové oleje – Lukooil. Jejich důležitými vlastnostmi jsou nevodivost, netěkavost, chemická a elektrochemická inertnost a nemísitelnost s vodnými roztoky<sup>18</sup>.

Pro vytvoření ještě specifitějších vlastností a dosažení nižších mezí detekce je možné pastu modifikovat. To učinil R. N. Adams již v 60. letech. Modifikace je možná několika způsoby - rozpuštěním organické látky do pastové kapaliny, vetřením modifikátoru do pasty nebo použitím elektroaktivní kapaliny<sup>19</sup>.

Příprava uhlíkové pasty je velmi jednoduchá. Grafitový prášek a pastová kapalina jsou smíchány v poměru asi 1 g uhlíku a 0,4 ml kapaliny. Vytvořená pasta, konsistencí podobná burákovému máslu, je vpravena pomocí špachtličky do pouzdra elektrody, které je znázorněno na obr. 1.1. Elektrodu je doporučeno nechat nejlépe přes noc zhomogenizovat. Je experimentálně ověřeno, že čerstvá pasta vykazuje nestabilní chování. Před každým měřením je potřeba obnovit povrch uhlíkové elektrody. To se provádí vytlačení malého množství pasty pomocí pístu se závitem. Ta je odstraněna např. do navlhčeného filtračního papíru. Pastu je možné skladovat několik týdnů až měsíců, ponořenou koncovým otvorem v destilované vodě, aby se zabránilo jejímu vysychání.

CPEs mají poměrně široký potenciálový rozsah. V kyselých roztocích je přibližně -1,0 V až +1,5 V vs Ag/AgCl, v neutrálních -1,3 V až +1,4 V a v alkalických roztocích se rozsah pohybuje v rozmezí -1,2 V až +1,2V. Pro měření při potenciálech nižších než -0,5 V však nejsou příliš vhodné, protože měření znesnadňuje nezanedbatelný proud, jenž vzniká v důsledku redukce kyslíku rozpuštěného v pastě<sup>20</sup>.

CPEs mají velmi širokou oblast uplatnění. Používají se v analýze anorganické (stanovení kovů), i organické. Zde se jedná především o monitorování kvality léčiv, průmyslových výrobků a environmentálních vzorků<sup>19</sup>. CPEs jsou nejčastěji využívány ve voltametrické, dále pak v amperometrické, coulometrické nebo potenciometrické.



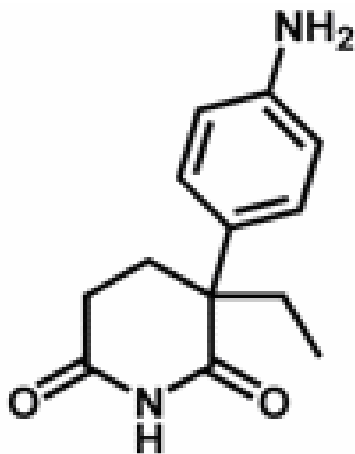
- 1 otvor pro elektrický kontakt
- 2 teflonová hlava
- 3 píst se závitem
- 4 tělo elektrody
- 5 ocelová vložka se závitem
- 6 dutina s uhlíkovou pastou
- 7 koncový otvor

**Obr. 1.1** Uhlíková pastová elektroda<sup>20</sup>

## 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 CHEMIKÁLIE

Aminoglutethimid, účinná složka například léku Cytadren, se používá zejména při léčbě karcinomu prsu (prostaty, Cushingova syndromu<sup>21</sup> aj.). Strukturální vzorec je na obr. 2.1, základní vlastnosti látky jsou uvedeny v tabulce II<sup>5</sup>.



Obr. 2.1 Strukturální vzorec AGT<sup>2</sup>

Tabulka II

Triviální název	Aminoglutethimid
Systematický název	(3 <i>RS</i> )-3-(4-aminofenyl)-3-ethylpiperidin-2,6-dion
CAS number	125 – 84 - 8
Sumární vzorec	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<i>M<sub>r</sub></i>	232,27
Teplota tání	150 – 154 °C
Vlastnosti	Bílý nebo nažloutlý krystalický prášek
Rozpustnost	Ve vodě nerozpustný, v acetonu a methanolu ano

Zásobní roztok AGT o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  byl připraven rozpuštěním 0,02323 g AGT ve 100 ml methanolu, uchováván byl v chladu a tmě.

Pro pokrytí rozsahu pH 2 – 12 byl vybrán Brittonův-Robinsonův (BR) pufr. Požadovaného pH bylo docíleno smísením kyselé složky pufru, tvořeného kys. fosforečnou, octovou a kys. boritou, vždy o koncentraci  $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ , se zásaditou složkou tvořenou  $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$  NaOH.

Uhlíková pasta byla připravena smísením 250 mg uhlíkových mikrokuliček a 100  $\mu\text{l}$  minerálního oleje.

## 2.2 APARATURA

Pro všechna měření byla použita sestava Eco-Tribo Polarograph se softwarem Polar Pro verze 5.1. Ten pracoval v operačním systému Windows XP.

Sestava pracovala v tříelektrodovém zapojení, jako referentní elektroda byla použita argentchloridová elektroda Ag/AgCl/3M KCl, RAE, Monokrystaly Turnov pomocnou elektrodou byla platinová drátková elektroda.

UV/VIS spektrum látky bylo měřeno na přístroji Pye-Unicam PU 8800 UV/VIS spectrophotometer v křemenných kyvetách měrné tloušťky 0,1 cm.

Hodnoty pH byly zjištěny digitálním pH-metrem Jenway s kombinovanou skleněnou elektrodou.

## 2.3 POSTUP

Do 10ml odměrné baňky bylo napipetováno 0 – 1 ml roztoku AGT, který byl podle požadované koncentrace doplněn methanolem na celkový objem 1 ml. Odměrná baňka byla po rysku doplněna BR pufrům o požadovaném pH. Roztok byl promíchán a převeden do voltametrické nádoby. Měření probíhala za laboratorní teploty.

Před každým měřením byl povrch elektrody obnoven mechanickým očištěním.

Mez detekce byla vypočtena jako trojnásobek směrodatné odchylky měření nejnižší stanovované koncentrace.

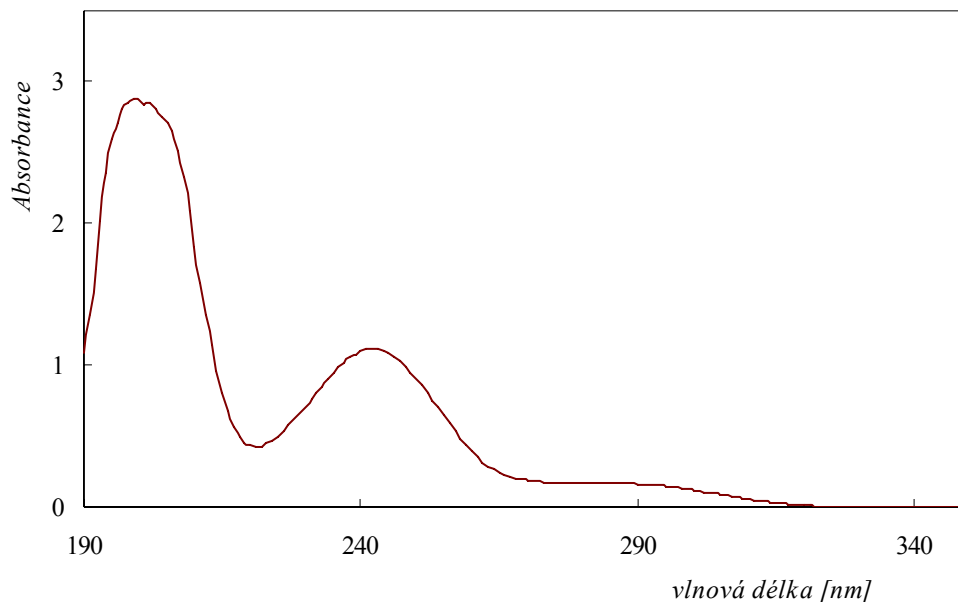
### 3. VÝSLEDKY A DISKUZE

#### 3.1 SLEDOVÁNÍ STÁLOSTI ROZTOKU AMINOGLUTETHIMIDU

Zásobní roztok AGT o koncentraci  $1.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  byl sledován po celou dobu měření. Spektrum bylo měřeno v křemenných kyvetách o tloušťce 1 mm, referenční látkou byl methanol. Absorpční maximum sledované látky bylo při 242 nm. Spektrum látky je na obr. 3.1. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce III, ze které vyplývá, že absorbance se výrazně neměnila. Zásobní roztok byl použit po celou dobu měření.

**Tabulka III:** Hodnoty absorbancí zásobního roztoku  $1.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  AGT při 242 nm. Měřeno proti methanolu v křemenných kyvetách šířky 0,1 cm.

Dny	0	2	6	14	22
Absorbance	1,113	1,111	1,116	1,127	1,070
%	100,0	99,8	100,3	101,3	96,1



**Obr. 3.1** Absorpční spektrum zásobního roztoku  $1.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  AGT. Měřeno proti methanolu v křemenných kyvetách měrné tloušťky 0,1 cm.

### 3.2 VLIV PH NA VOLTAMETRICKÉ CHOVÁNÍ AMINOGLUTETHIMIDU

Vliv pH na DP voltametrické chování  $1.10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>AGT na CPE byl sledován v prostředí BR pufru pH 2-12. Sledovaná látka poskytovala v celém rozsahu pH jeden pík. Závislosti potenciálu píku  $E_p$  a proudu píku  $I_p$  na pH jsou uvedeny v tabulce IV.

Voltametrické křivky jsou zaznamenány na obr. 3.2, grafické znázornění závislosti potenciálu  $E_p$  a proudu píku  $I_p$  na pH na obr. 3.3 resp. 3.4.

Pro závislost potenciálu píku  $E_p$  na pH byla získána rovnice:

$$E_p [\text{mV}] = -35,18 \text{ pH} + 964,6$$

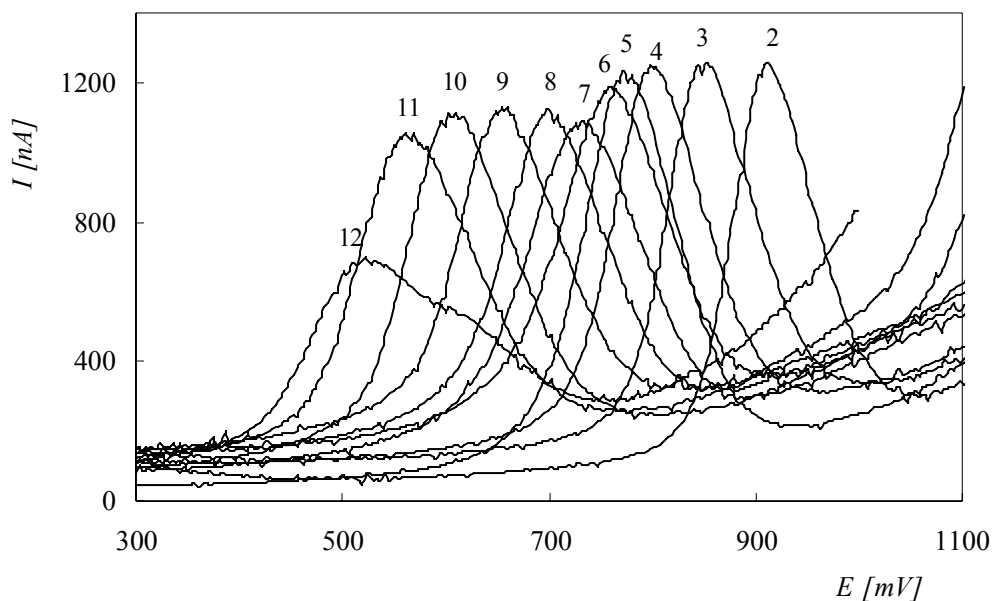
Sledovaná látka poskytovala vhodné píky v oblasti pH 2 – 11. Jako optimální bylo stanoveno pH 4, kde byl pík nejvyšší.

Při tomto pH byla měřena kalibrační závislost. Další měření probíhala i v prostředí neutrálním (pH 7) a zásaditém (pH 10). Jejich důvodem bylo studium možnosti snížení meze detekce AGT využitím možné akumulace analytu na povrchu pracovní elektrody.

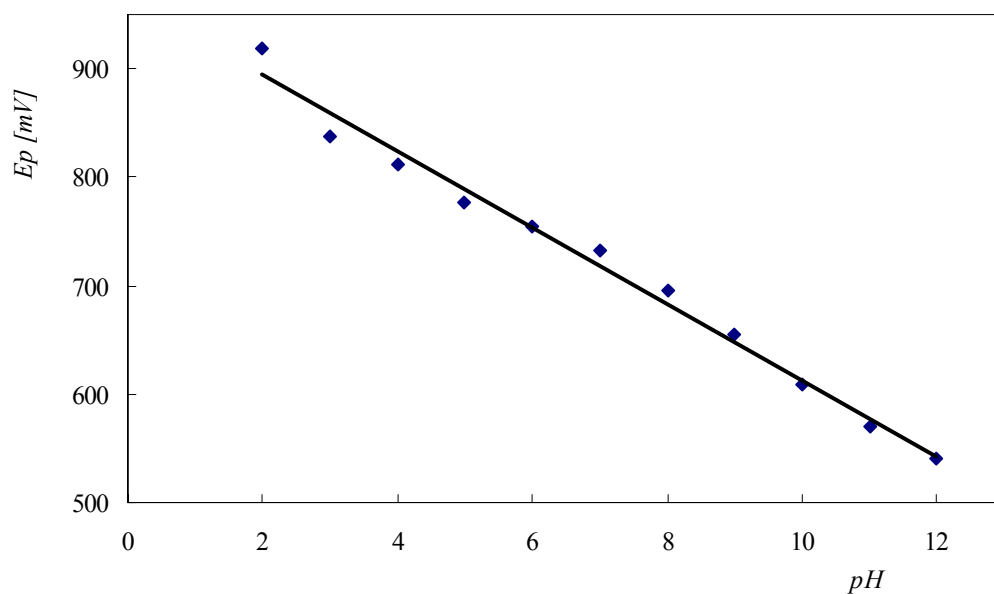
**Tabulka IV** Hodnoty potenciálu píku  $E_p$  a proudu píku  $I_p$   $1.10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>AGT pro DPV na CPE v prostředích methanolu a BR pufru (1:9).

pH BR pufru	pH* směsi	$E_p$ [mV]	$I_p$ [nA]
2,00	2,40	918	992
3,00	3,15	838	1053
4,00	4,15	811	1063
5,00	5,14	777	1053
6,00	6,19	755	1013
7,00	7,23	732	793
8,00	8,21	696	810
9,00	9,17	655	874
10,00	10,05	608	903
11,00	11,04	571	757
12,00	11,85	540	406

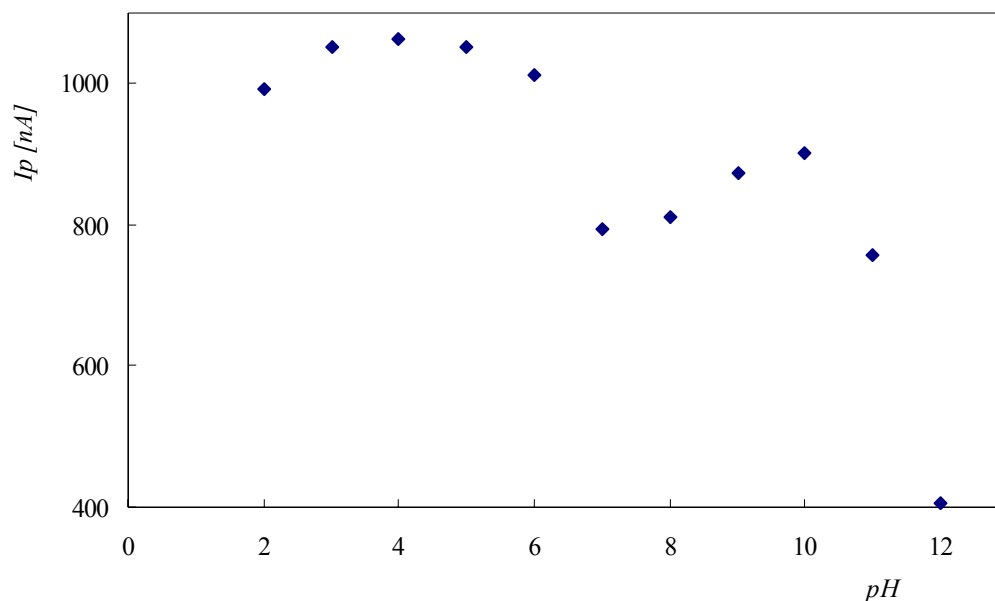
pH\* hodnota směsného prostředí (kalibrováno na vodné pufr)



**Obr. 3.2** Vliv pH na DP voltamogramy  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  AGT na CPE v prostředí methanolu a BR pufru o zvoleném pH (1:9). Číslo voltamogramu odpovídá pH BR pufru.



**Obr. 3.3** Závislost potenciálu píku  $E_p$   $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  AGT pro DPV na CPE na pH v prostředí methanolu a BR pufru pH 2 - 12 (1:9). Hodnota pH odpovídá hodnotě BR pufru.



**Obr. 3.4** Závislost proudu píku  $I_p$   $1 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> AGT pro DPV na CPE na pH v prostředí methanolu a BR pufru pH 2 - 12 (1:9). Hodnota pH odpovídá hodnotě BR pufru.

### 3.3 KALIBRAČNÍ ZÁVISLOST

Kalibrační závislost byla měřena v prostředí BR pufru o pH 4. V tabulce V jsou uvedeny parametry kalibračních přímk.

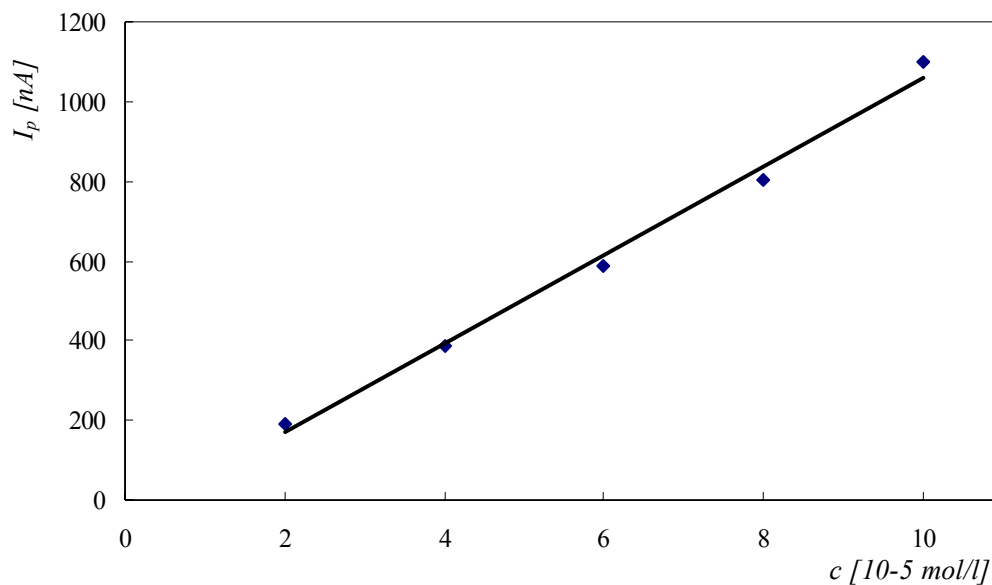
DP voltamogramy AGT na CPE v rozmezí koncentrací  $2 \cdot 10^{-5}$  –  $1 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> ukazuje obr. 3.7, DP voltamogramy pro koncentrační rozmezí  $2 \cdot 10^{-6}$  –  $1 \cdot 10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> obr. 3.8. Závislosti proudu píku  $I_p$  na koncentraci v rozmezí  $2 \cdot 10^{-5}$  –  $1 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> znázorňuje obr. 3.5, koncentraci  $2 \cdot 10^{-6}$  –  $1 \cdot 10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> obr. 3.6.

Mez detekce byla vypočítána z rovnice regrese jako trojnásobek směrodatné odchylky z hodnot naměřených pro nejnižší koncentraci, tedy  $2 \cdot 10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup>.

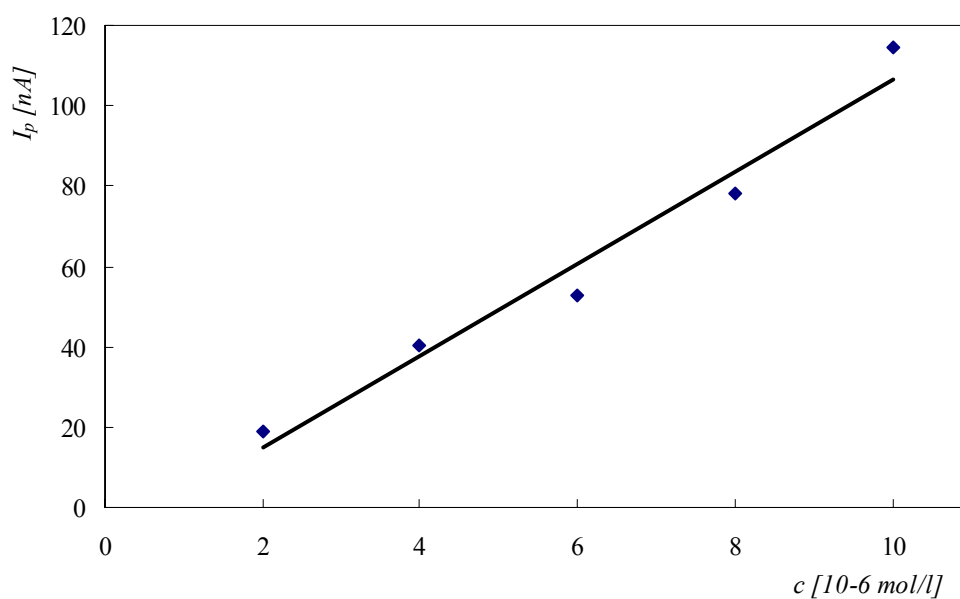
**Tabulka V**

Koncentrace [mol.l <sup>-1</sup> ]	Směrnice [nA.mol <sup>-1</sup> .l]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	Mez detekce [mol.l <sup>-1</sup> ]
$1 \cdot 10^{-4}$ – $2 \cdot 10^{-5}$	11,15	-54,6	0,9920	-
$1 \cdot 10^{-5}$ – $2 \cdot 10^{-6}$	11,46	-7,9	0,9666	$1,37 \cdot 10^{-6}$

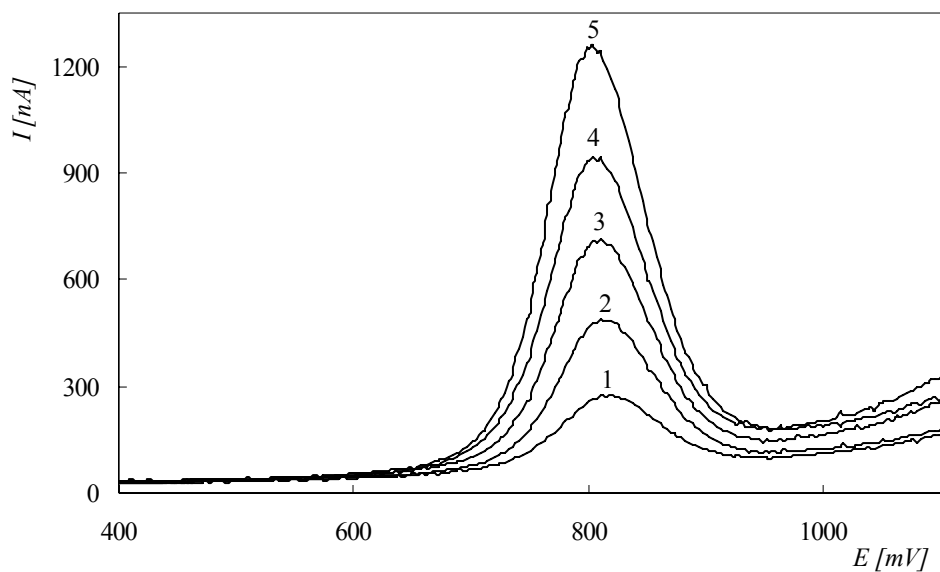




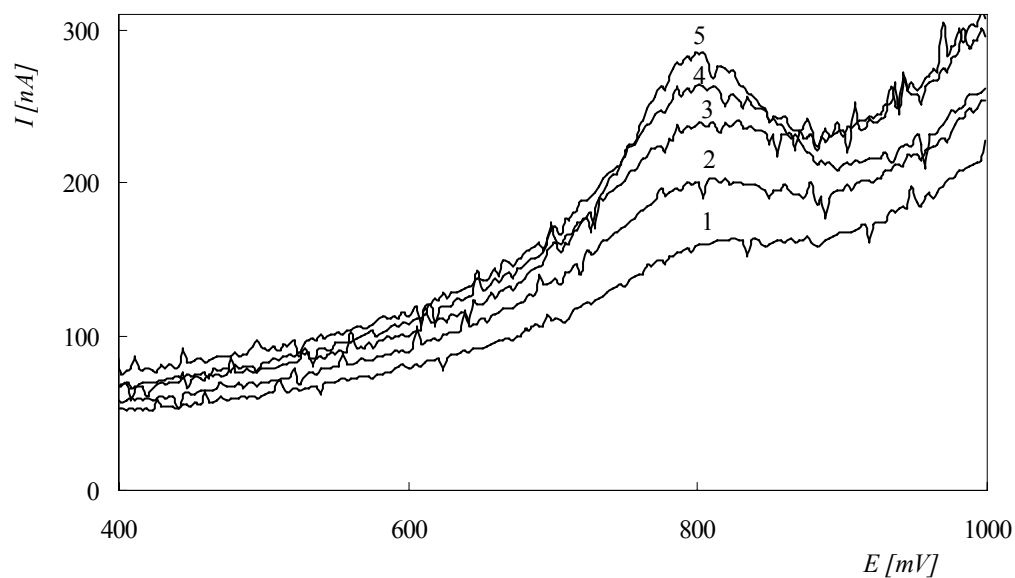
**Obr. 3.5** Závislost DP voltametrického proudu píku  $I_p$  na CPE na koncentraci AGT v rozmezí koncentrací  $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> v methanolu a BR pufru pH 4 (1:9)



**Obr. 3.6** Závislost DP voltametrického proudu píku  $I_p$  na CPE na koncentraci AGT v rozmezí koncentrací  $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> v methanolu a BR pufru pH 4 (1:9)



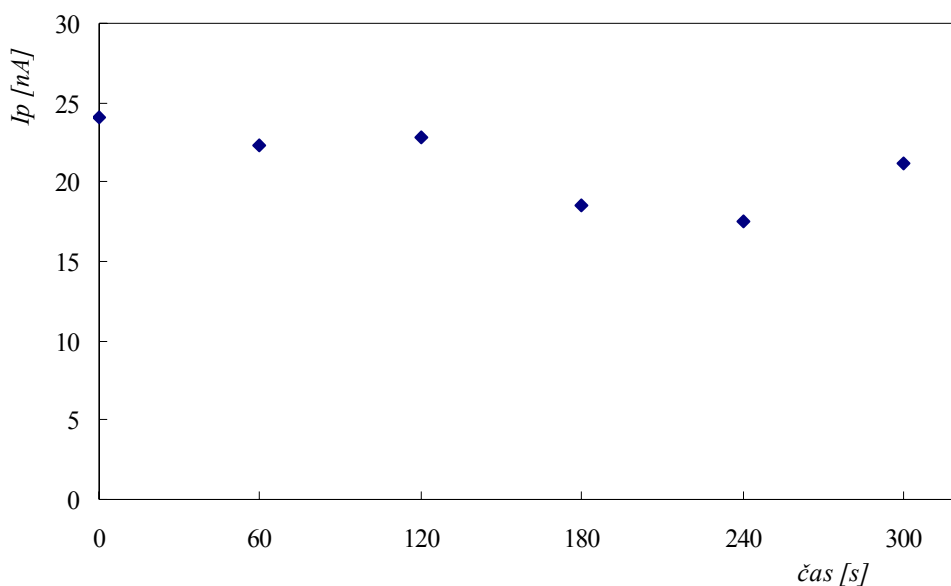
**Obr. 3.7** DP voltamogramy AGT na CPE pro koncentrace  $2 \cdot 10^{-5}$  (1),  $4 \cdot 10^{-5}$  (2),  $6 \cdot 10^{-5}$  (3),  $8 \cdot 10^{-5}$  (4) a  $1 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> (5) v prostředí methanolu a BR pufru pH 4 (1:9)



**Obr. 3.8** DP voltamogramy AGT na CPE pro koncentrace  $2 \cdot 10^{-6}$  (1),  $4 \cdot 10^{-6}$  (2),  $6 \cdot 10^{-6}$  (3),  $8 \cdot 10^{-6}$  (4) a  $1 \cdot 10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> (5) v prostředí methanolu a BR pufru pH 4 (1:9)

### 3.4 STUDIUM AKUMULACE AGT NA CPE

Za účelem snížení meze detekce aminoglutethimidu při DP voltametrii na CPE bylo provedeno studium akumulace analytu na povrchu pracovní elektrody. Adsorpční akumulace analytu na povrchu pracovní elektrody totiž může vést ke značnému zcitlivění analytické metody. Akumulace AGT na CPE byla studována s koncentrací  $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  AGT, a to technikou DPV při pH 4, 7 a 10, aby bylo možno vyhodnotit adsorpci AGT v jejích různých formách v prostředích o různé koncentraci vodíkových iontů. Po dobu akumulace, která trvala 0 – 5 minut, byl roztok míchán. Při žádném ze studovaných pH prostředí nebylo dosaženo nějaké výrazné akumulace analytu na CPE. Pro ilustraci je DP voltamogram  $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  AGT naměřený v prostředí BR pufru o pH 10 uveden na obr. 3.9, graf závislosti proudu píku  $I_p$  na době akumulace na obr. 3.10. Vzhledem k tomu, že AGT se za studovaných podmínek neakumuluje na povrchu elektrody, nebylo dosaženo zcitlivění metody stanovení.



**Obr. 3.9** Závislost proudu píku  $I_p$   $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  AGT v prostředí methanolu a BR pufru pH 10 (1:9) na době akumulace. Měřeno pomocí DPV na CPE.

### 3.5 CYKLIČKÁ VOLTAMETRIE AGT

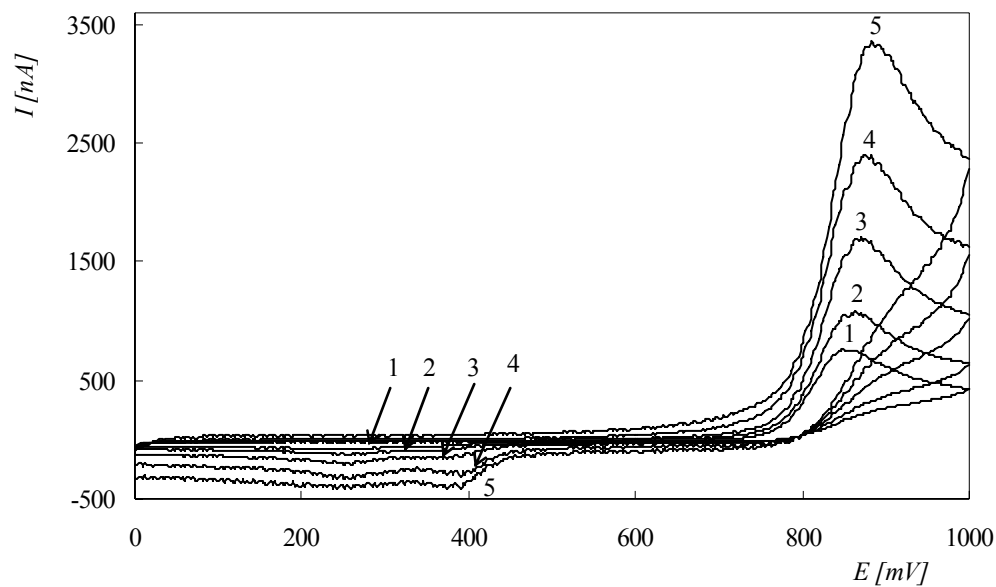
Cyklická voltametrie je metoda, při níž je vkládán na stacionární elektrodu tzv. potenciál trojúhelníkového průběhu s různou rychlostí změny potenciálu na čase ( $dE/dt$ ). Metoda se využívá při studiu mechanismu elektrodových reakcí, např. při sledování reversibility elektrodového děje. Roztok není míchán, proto při dostatečně vysoké rychlosti nárůstu potenciálu produkty nestačí oddifundovat a je možné je stanovit při opačném směru potenciálové změny.

Při reverzibilním ději je poměr anodického a katodického píku  $I_{pa}/I_{pc}$  přibližně 1, rozdíl potenciálů anodického a katodického píku  $E_{pa} - E_{pc}$  je roven  $59 \text{ mV/počet vyměňovaných elektronů}$ . Při ireverzibilní reakci, kde je děj řízený difuzí, je výška píku přímo úměrná odmocnině z rychlosti nárůstu potenciálu. Pokud se látka adsorbuje na povrch pracovní elektrody, je výška píku přímo úměrná rychlosti nárůstu potenciálu a kalibrační závislost neprochází počátkem<sup>22</sup>.

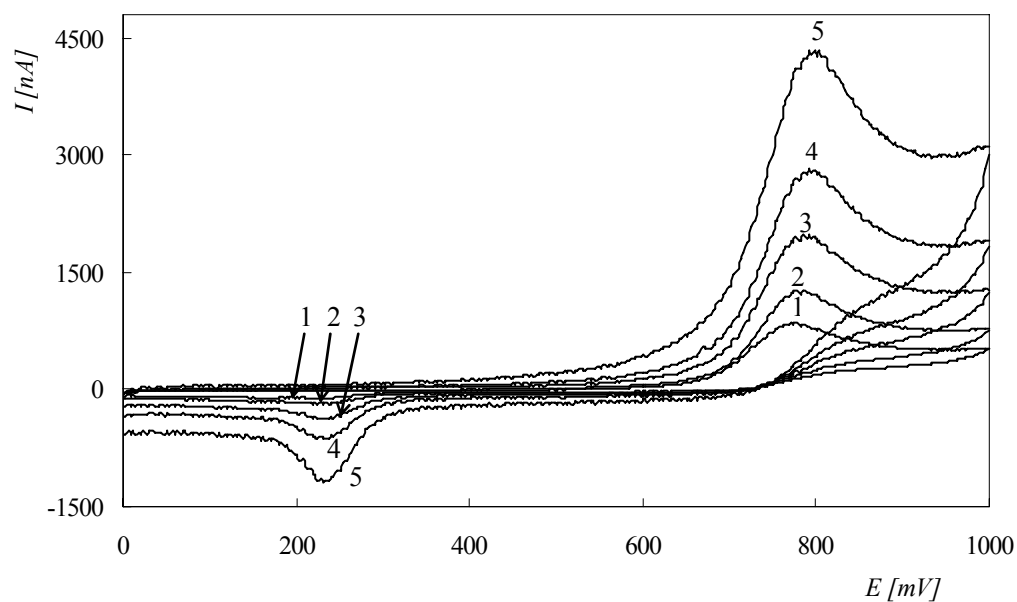
Cyklické voltamogramy a grafické znázornění závislosti proudu píku  $I_{pa}$  na odmocnině z rychlosti polarizace  $1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  AGT jsou na Obr. 3.10 a 3.13 pro pH 4, Obr. 3.11 a 3.14 pro pH 7 a na Obr. 3.12 a 3.14 pro pH 10.

Z voltamogramů a grafů závislosti je patrné, že probíhající reakce je ireverzibilní, děj je řízen difuzí.

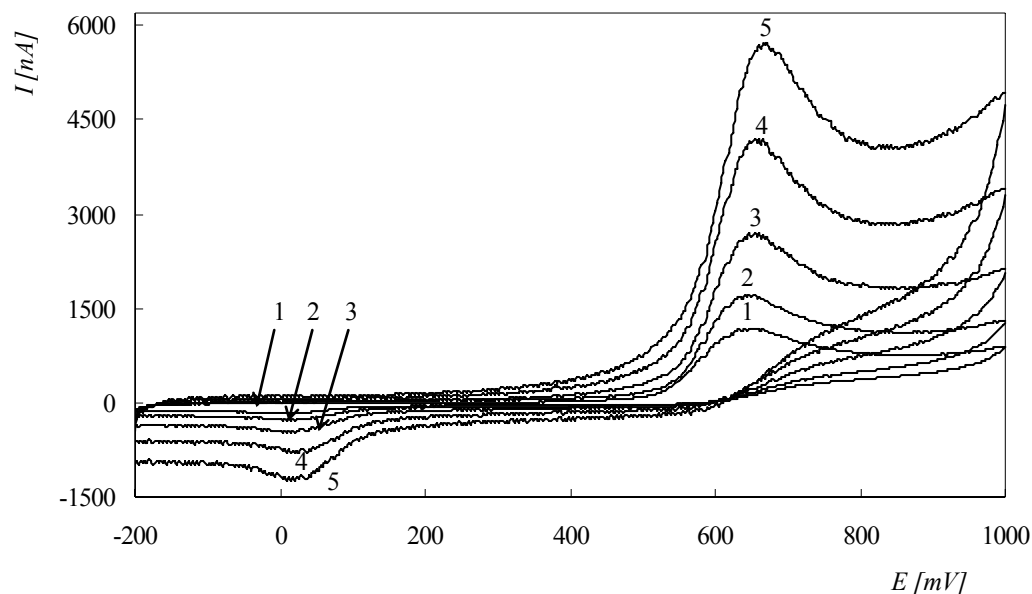
Metodou CV s více cykly bylo sledováno, zda má neobnovení povrchu CPE před každým měřením vliv na výšku signálu píku  $I_p$ . Cyklické voltamogramy jsou na Obr. 3.15 (pH 4), 3.16 (pH 7) a na Obr. 3.17 (pH 10). Z nich vyplývá, že obnovení povrchu CPE je důležitým krokem před každým měřením. Ve druhém cyklu byla totiž detegována látka odlišná od AGT, která vzniká v prvním cyklu redukcí oxidovaného produktu AGT a která je ve druhém cyklu oxidována již při mnohem pozitivnějším potenciálu než původní AGT.



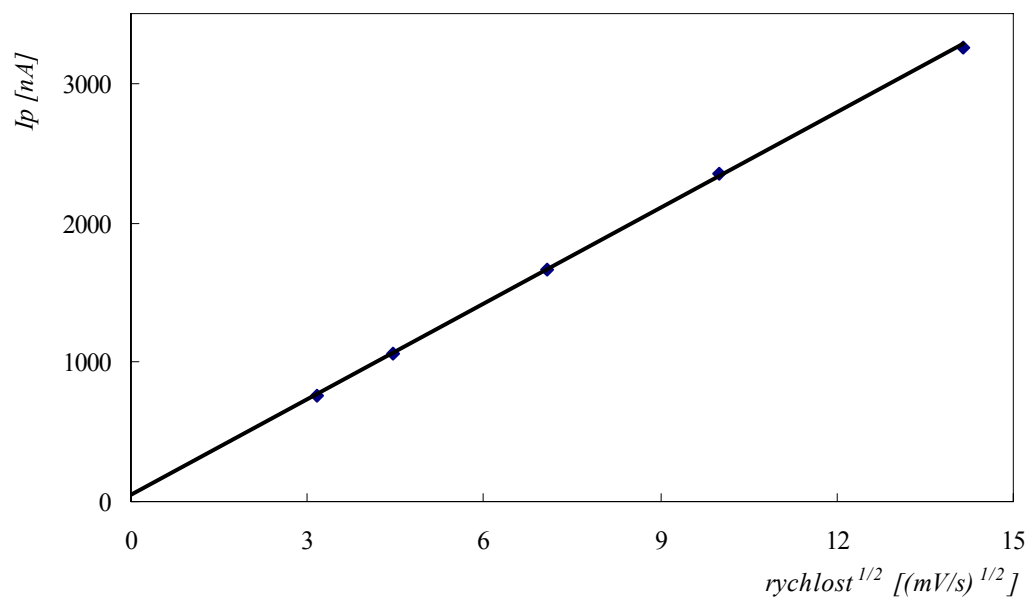
**Obr. 3.10** Cyklické voltamogramy  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  AGT na CPE v prostředí methanolu a BR pufru pH 4 (1:9). Použito rychlosti nárůstu potenciálu 10 (1), 20 (2), 50 (3), 100 (4) a 200  $\text{mV.s}^{-1}$  (5).



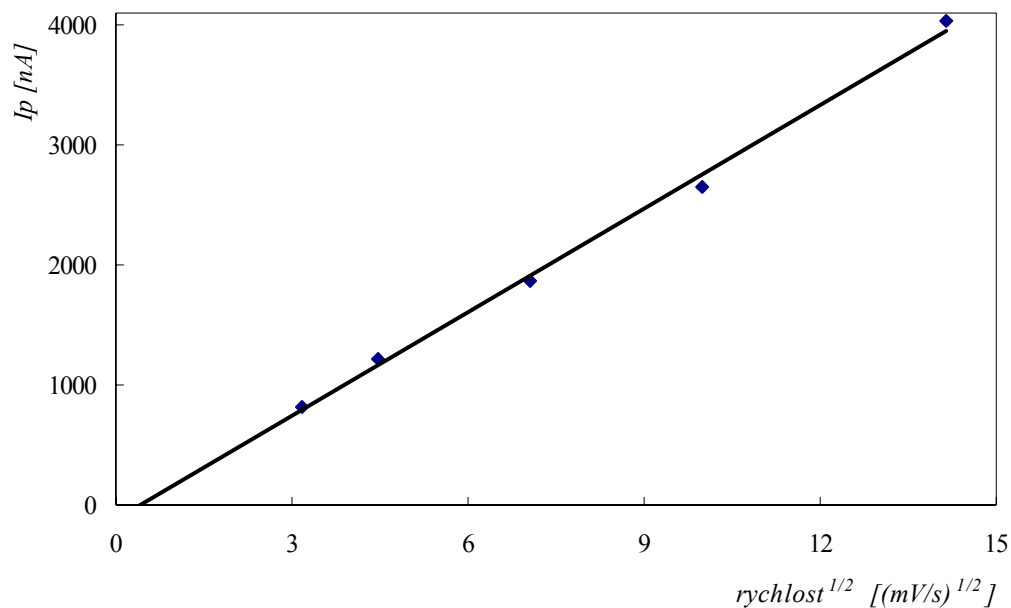
**Obr. 3.11** Cyklické voltamogramy  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  AGT na CPE v prostředí methanolu a BR pufru pH 7 (1:9). Použito rychlosti nárůstu potenciálu 10 (1), 20 (2), 50 (3), 100 (4) a 200  $\text{mV.s}^{-1}$  (5).



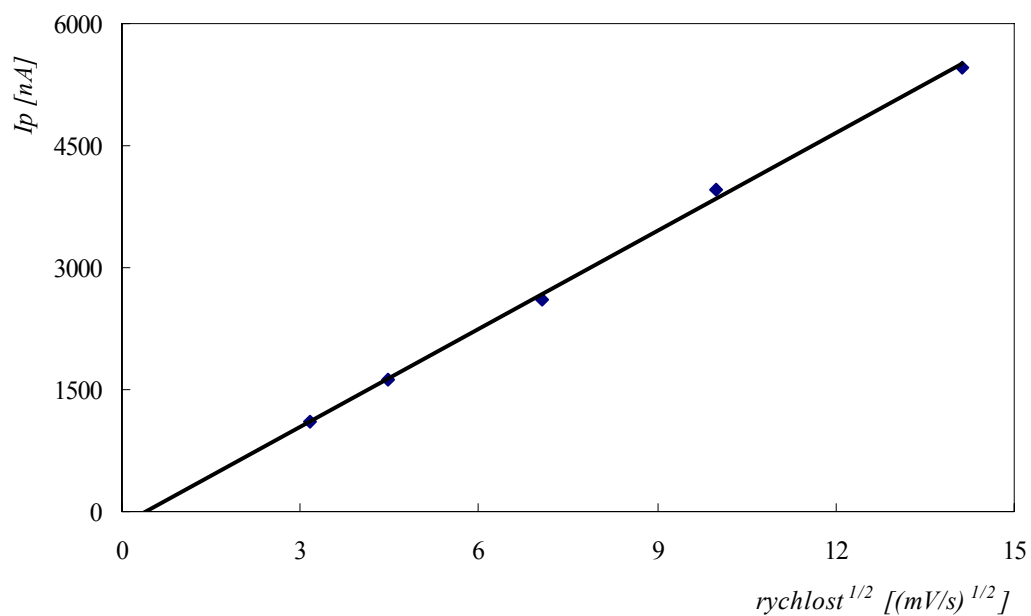
**Obr. 3.12** Cyklické voltamogramy  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  AGT na CPE v prostředí methanolu a BR pufru pH 10 (1:9). Použito rychlosti nárůstu potenciálu 10 (1), 20 (2), 50 (3), 100 (4) a  $200 \text{ mV.s}^{-1}$  (5).



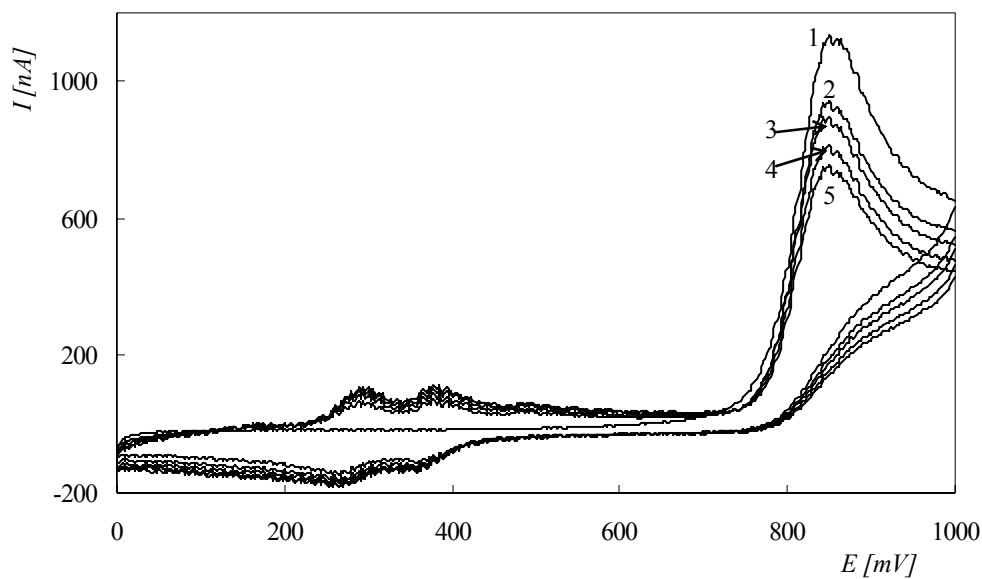
**Obr. 3.13** Závislost proudu píku  $I_{pa}$  na druhé odmocnině rychlosti nárůstu potenciálu  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  AGT v prostředí methanolu a BR pufru pH 4 (1:9). Měřeno pomocí CV na CPE.



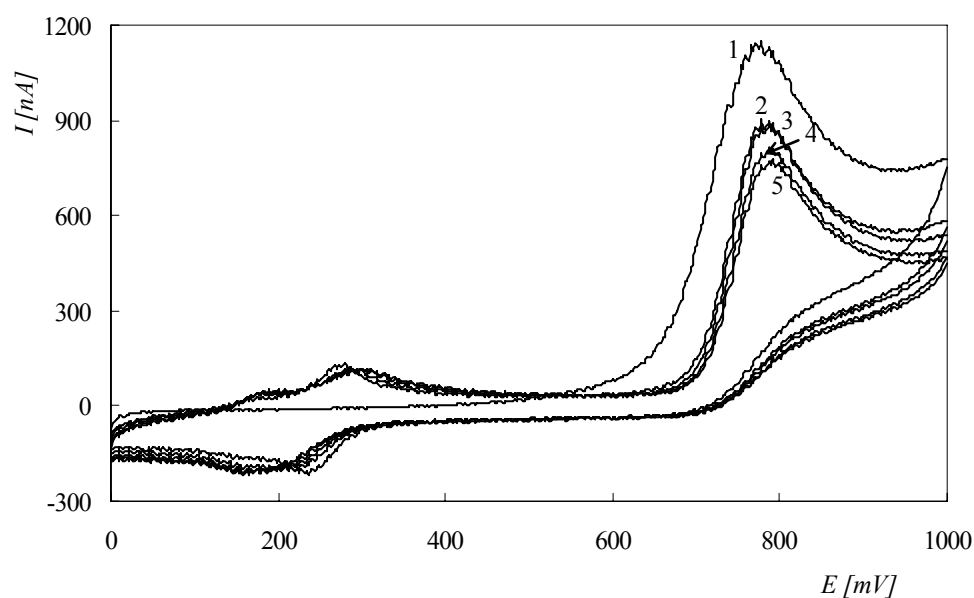
**Obr. 3.14** Závislost proudu píku  $I_{pa}$  na druhé odmocnině rychlosti nárůstu potenciálu  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  AGT v prostředí methanolu a BR pufru pH 7 (1:9). Měřeno pomocí CV na CPE.



**Obr. 3.15** Závislost proudu píku  $I_{pa}$  na druhé odmocnině rychlosti nárůstu potenciálu  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  AGT v prostředí methanolu a BR pufru pH 10 (1:9). Měřeno pomocí CV na CPE.

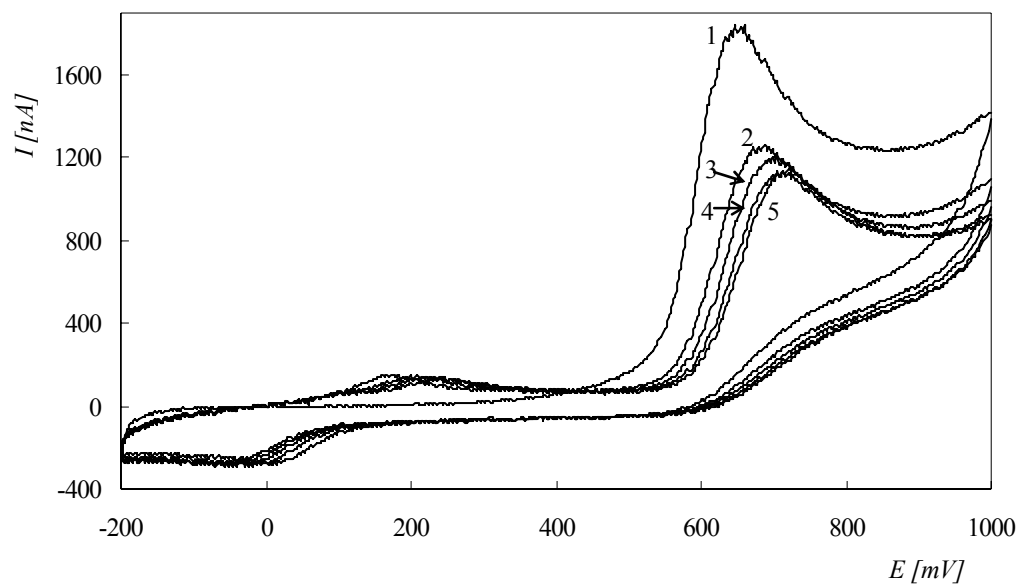


**Obr. 3.16** Cyklické voltamogramy  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  AGT v prostředí methanolu a BR pufru pH 4 (1:9). Čísla 1 - 5 udávají pořadí cyklů. Měřeno pomocí CV na CPE.



**Obr. 3.17** Cyklické voltamogramy  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  AGT v prostředí methanolu a BR pufru pH 7 (1:9). Čísla 1 - 5 udávají pořadí cyklů. Měřeno pomocí CV na CPE.

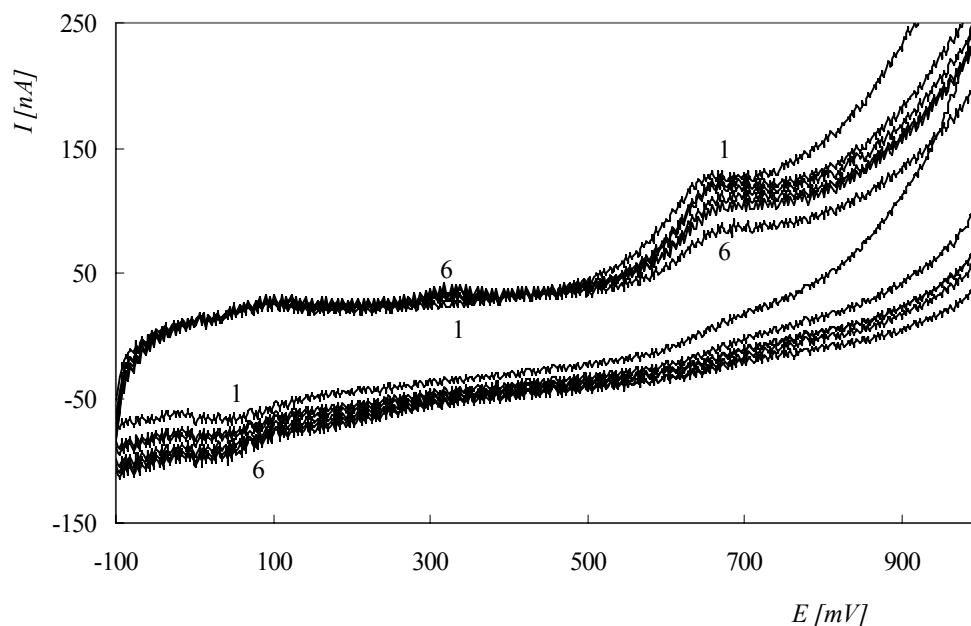




**Obr. 3.18** Cyklické voltamogramy  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  AGT v prostředí methanolu a BR pufru pH 10 (1:9). Číslo 1 - 5 udávají pořadí cyklů. Měřeno pomocí CV na CPE.

Vzhledem ke skutečnosti, že při katodickém skenu se v cyklickém voltamogramu objevil pík nové látky, která se při následném anodickém skenu oxiduje, a to již při nižším potenciálu než mateřský AGT, byl učiněn pokus o využití této reakce ke snížení meze detekce metody. Hodnoty proudů píků však byly poměrně nízké. K jejich zvýšení a tedy teoretické možnosti snížit mez detekce byla prostudována možnost akumulace této látky na povrchu pracovní CPE. Měření byla provedena při pH 4, pH 7 a pH 10. Roztok nebyl míchán, akumulace (tedy generování oxidovaného produktu AGT) probíhala při napětí +1000 mV po dobu 0 s (1), 60 s, 120 s, 180 s, 240 s a 300 s (6), viz obr. 3.19.

V žádném ze studovaných prostředí však k významnější akumulaci nedocházelo, přesto by bylo možno říci, že proudová odezva látky je přímo úměrná době akumulace, proudová odezva AGT naopak nepřímo úměrná. Pro ilustraci je na obr. 3.19 uveden cyklický voltamogram v prostředí BR pufru o pH 10.



**Obr. 3.19** Cyklické voltamogramy  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  AGT na CPE v prostředí methanolu a BR pufru pH 10 (1:9), kterým předcházela oxidační akumulace po dobu 0 s (1), 60 s, 120 s, 180 s, 240 s a 300 s (6)

## 4. SHRNUTÍ

Spektrofotometricky byla ověřena stálost zásobního roztoku AGT v methanolu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  nejméně po dobu měření tj. 22 dní. Roztok byl uchováván v chladu a temnu.

Bylo prostudováno elektrochemické chování AGT metodou DPV a CV na CPE. Byla prostudována závislost proudu píku  $I_p$  a potenciálu píku  $E_p$   $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  AGT na pH v rozsahu 2 – 12 pro DPV na CPE. Látka poskytovala vhodné píky v rozsahu 2 – 11, jako optimální bylo zvoleno pH 4, kde byl proud píku  $I_p$  nejvyšší.

Byla proměřena kalibrační závislost AGT v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Odtud pak byla vypočtena mez detekce. Její hodnota je  $1,37 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ .

Byla prověřena možnost snížení meze detekce pomocí akumulace AGT na povrch pracovní elektrody. Akumulace AGT na CPE byla prováděna s roztokem o koncentraci  $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  v prostředí o pH 4, 7 a 10. Ani v jednom případě nedocházelo k výraznější akumulaci na povrch elektrody, ke snížení meze detekce nedošlo.

Metodou CV bylo zjištěno, že reakce AGT probíhá ireverzibilně. Lineární závislost proudu píku  $I_{pa}$  na odmocnině z rychlosti polarizace ukázala, že děj je řízen difuzí. Dále bylo cyklickou voltametrií dokázáno, že při měření více cyklů za sebou bez obnovení povrchu elektrody dochází k její pasivaci, hodnoty naměřeného proudu píku  $I_p$  s každým dalším cyklem klesaly. Pomocí cyklické voltametrie bylo rovněž zjištěno, že produkt oxidace AGT je při zpětném skenu redukován na látku odlišnou od AGT. Tento vzniklý produkt je v následujícím skenu pravděpodobně reverzibilně oxidován na látku, jež podléhá oxidaci mnohem snadněji než výchozí AGT. K její akumulaci na CPE nedocházelo. Naměřené píky nebyly vyhodnoceny z důvodů nízkých proudových hodnot, které by byly zatíženy velkou chybou.

## 5. LITERATURA

1. Mitwally, M.F.; Casper, R.F.; Inhibitory aromatázy a prevence karcinomu prsu, *Gynekologie po promoci*, Březen/Duben (2004).
2. Brueggemeier, R.W.; Hackett, J.C.; Diaz-Cruz, E.S.; Aromatase Inhibitors in the Treatment of Breast Cancer, *Endocrine Reviews* **26**, 331-45 (2005).
3. Lien, E.A.; Anker, G.; Lønning, P.E.; Solheim, E.; Ueland, P.M.; Decreased Serum Concentrations of Tamoxifen and Its Metabolites Induced by Aminoglutethimide, *Cancer Research* **15**, 5851 – 5857 (1990).
4. Salhanick, H.A.; Basic Studies on Aminoglutethimide, *Cancer Research* **42**, 3315 - 3321 (1982).
5. Duval, R.; Lévêque, H; Prigent, Y; Aboul-Enein, H.Y; Enantioseparation of Aminoglutethimide and Thalidomide by High-Performance Liquid Chromatography or Supercritical Fluid Chromatography on Mono-2 and Mono-6-O-Pentenyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Based Chiral Stationary Phases, *Biomedical Chromatography* **15**, 202 – 206 (2001).
6. Aboul-Enein, H.Y; El-Awady, M.I.; Heard, C.M.; Enantiomeric Separation of Aminoglutethimide, Acetyl Aminoglutethimide and Dansyl Aminoglutethimide by TLC with  $\beta$ -Cyclodextrin and Derivatives as Mobile Phase Additives, *Journal of Liquid Chemistry & Related Technologies* **23**, 2715 – 2726 (2000).
7. Anigbogu, V.C.; Copper, C.L.; Sepaniak, M.J.; Separation of Stereoisomers of Aminoglutethimide Using Three Capillary Electrophoretic Techniques, *Journal of Chromatography A* **705**, 343 – 349 (1995).
8. *Český lékopis 2002, 2. díl-Léčivé a pomocné látky*. Grada Publishing, Praha (2003).
9. Schanche, J.S.; Lønning, P.E.; Ueland, P.M.; Kvinnsland, S.; Determination of Aminoglutethimide and N-acetylamino-glutethimide in Human Plasma by Reversed-Phase Liquid Chromatography, *Therapeutic Drug Monitoring* **6**, 221 – 226 (1984).
10. Robinson, B.A.; Cornell, F.N.; Liquid-chromatographic Determination of Aminoglutethimide in Plasma, *Clinical Chemistry* **29**, 1104 – 1108 (1983).
11. Menge, G.; Dubois, J.P.; Determination of Aminoglutethimide and N-acetylamino-glutethimide in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography* **310**, 431 – 437 (1984).

12. Kamblawi, M.O.; Stevens, R.G.; Nicholls, P.J.; High-Performance Liquid Chromatography Assay for Aminoglutethimide and Its Acetylated Metabolite in Urine, *Journal of Chromatography* **309**, 431 – 435 (1984).
13. Cesur, N.; Apak, T.I.; Aboul-Enein, H.Y.; Özkırımlı, S.; LC Determination of Aminoglutethimide Enantiomers as Dansyl and Fluorescamine Derivatives in Tablet Formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **28**, 487–492 (2002).
14. Adam, A.M.; Rogers, H.J.; Gas-Liquid Chromatographic Assay of Aminoglutethimide and a High-Performance Liquid Chromatographic Assay for Its Acetyl Metabolite in Biological Fluids, *Journal of Chromatography* **307**, 129 – 135 (1984).
15. Mareck, U.; Sigmund, G.; Opfermann, G.; Geyer, H.; Schänzer, W.; Identification of the Aromatase Inhibitor Aminoglutethimide in urine by Gas-Chromatography/Mass Spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **16**, 2209 – 2214 (2002).
16. Abdel-Khalek, M.M.; Mahrous, M.S.; Daabees, H.G.; Beltagy, Y.A.; Spectrophotometric Determination of Aminoglutethimide by Diazotization and Subsequent Coupling, *Analytical Letters* **26**, 1109 – 1123 (1993).
17. Adams, R.N.; Carbon Paste Electrodes, *Analytical Chemistry* **30**, 1576-1576 (1958).
18. Švancara, I.; Schachl, K.; Testing of Unmodified Carbon Paste Electrodes, *Chemické Listy* **93**, 490 – 499 (1999).
19. Švancara, I.; Vytřas, K.; Barek, J.; Zima, J.; Carbon Paste Electrodes in Modern Electroanalysis, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **31**, 311 – 345 (2001).
20. Švancara, I.; Vytřas, K.; Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod, *Chemické Listy* **88**, 138-146 (1994).
21. Engelhardt, D; Weber, M.M.; Therapy of Cushing's Syndrome with Steroid Biosynthesis Inhibitors, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **49**, 261 – 267 (1994).
22. Barek, J.; Opekar, F.; Štulík, K.; *Elektroanalytická chemie*, Karolinum, Praha (2005).