

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Kateřina Bártová

Interakce triazolu terkonazolu s kationty mědi

Interaction of triazole terconazole with copper cations

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. PhDr. Ing. Jana Jaklová Dytrtová, Ph.D.  
Konzultantka: prof. RNDr. Helena Ryšlavá, Csc.

Praha 2022

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu (Přf UK, FTVS UK) a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. je možné pouze po písemném souhlasu těchto institucí.

V Praze dne 24. 8. 2022

## Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. RNDr. PhDr. Ing. Janě Jaklové Dyrtrtové, Ph.D. a Ishakovi Kovacsovi, M.Sc. za vedení a pomoc při psaní této diplomové práce.

## Abstrakt

Terkonazol se řadí mezi triazoly s fungicidním účinkem a užívá se k lokální léčbě vaginálních infekcí. U žen, které mají zavedený typ nitroděložního tělíška, jehož mechanismus účinku spočívá v uvolňování iontů mědi, by mohlo ve vaginální oblasti docházet k interakci terkonazolu s ionty mědi. Příbuzné triazoly mění v komplexech s ionty  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  své vlastnosti jako je toxicita či mobilita. V přítomnosti triazolů a  $\text{Cu}^{2+}$  může dokonce docházet k redukci mědi na  $\text{Cu}^+$ , která může iniciovat tzv. Fentonovu reakci vedoucí k cyklické produkci volných radikálů. Systém  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$  a terkonazol je tak potenciálně rizikový. Stechiometrie, fragmentace a stabilita komplexů terkonazolu s ionty  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  byla studována pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. Systém byl měřen při pH 4 až 7,2, v rozmezí koncentrací  $\text{CuCl}_2$  a terkonazolu 1:5 až 20:1, ve směsi rozpouštědel voda ethanol (1:1). Z výsledků vyplývá, že v systému  $\text{Cu}^{2+}/\text{terkonazol}$  dochází k částečné oxidaci terkonazolu, která závisí na pH. Kromě oxidovaného a protonovaného terkonazolu nebyla intenzita dalších detekovaných iontů a komplexů hodnotou pH významně ovlivněna. Alarmující zjištění spočívá v existenci komplexů terkonazolu s  $\text{Cu}^+$ , což může dokazovat potenciální existenci Fentonovy reakce.

## Klíčová slova

Terkonazol, ionty mědi, komplexy, ESI-MS/MS, CID

## Abstract

Terconazole is one of the triazole derivatives with an antifungal effect. It is used locally to treat vaginal yeast infections. Terconazole could interact with copper cations in the vagina or uterus of women, who use an intrauterine device releasing copper cations. Other triazole derivatives in complexes with copper cations differ in their properties like toxicity or mobility.  $\text{Cu}^{2+}$  can be reduced in the presence of triazoles, which can lead to a Fenton-like reaction and production of free radicals. Thus, the  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$  terconazole system can be potentially dangerous. Stoichiometry, fragmentation and stability of forming complexes were studied with tandem mass spectrometry. The  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$  terconazole system was measured within pH range from 4 to 7.2, with a concentration ratio of  $\text{CuCl}_2$  and terconazole 1:5 to 20:1, with water and ethanol as solvents (1:1). Results suggest that terconazole is partially oxidized in the  $\text{Cu}^{2+}$ /terconazole system and that this oxidation depends on the pH of a solution. Apart from oxidized and protonated terconazole, other detected ions and complexes were not significantly influenced by pH. The detection of complexes containing  $\text{Cu}^+$  is alarming because this could correspond with the occurrence of a Fenton-like reaction.

## Key words

Terconazole, copper cations, complexes, ESI-MS/MS, CID

# Obsah

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>CÍLE PRÁCE</b> .....   | <b>9</b>  |
| 1.1      | HYPOTÉZY .....  | 9         |
| <b>2</b> | <b>TEORETICKÝ ÚVOD</b> .....  | <b>10</b> |
| 2.1      | TRIAZOLOVÉ FUNGICIDY .....  | 10        |
| 2.2      | MECHANISMUS ÚČINKU .....  | 10        |
| 2.3      | VEDLEJŠÍ ÚČINKY .....   | 11        |
| 2.4      | INTERAKCE KOVŮ S TRIAZOLY .....   | 12        |
| 2.5      | TERKONAZOL.....   | 13        |
| 2.6      | FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI TERKONAZOLU.....  | 14        |
| 2.7      | INTERAKCE IONTŮ MĚDI S TERKONAZOLEM .....   | 17        |
| 2.8      | NITRODĚLOŽNÍ TĚLÍŠKA UVOLŇUJÍCÍ MĚĎ .....   | 18        |
| 2.9      | MĚĎ V LIDSKÉM ORGANISMU .....   | 18        |
| 2.10     | HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE S IONIZACÍ ELEKTROSPREJEM A IONTOVOU PASTÍ .....                               | 19        |
|          | <b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....  | <b>21</b> |
| <b>3</b> | <b>MATERIÁL A METODY</b> .....  | <b>21</b> |
| 3.1      | POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....  | 21        |
| 3.2      | POUŽITÉ PŘÍSTROJE A PROGRAMY .....  | 21        |
| 3.3      | PŘÍPRAVA ROZTOKŮ.....   | 21        |
| 3.4      | PODMÍNKY MĚŘENÍ .....   | 22        |
| 3.5      | MS/MS EXPERIMENTY A STANOVENÍ AE .....  | 22        |
| <b>4</b> | <b>VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....   | <b>24</b> |
| 4.1      | ESI-MS SPEKTRUM TERKONAZOLU .....   | 24        |
| 4.2      | ESI-MS SPEKTRUM TERKONAZOLU A $\text{CuCl}_2$ .....   | 25        |
| 4.3      | OXIDACE TERKONAZOLU V PŘÍTOMNOSTI IONTŮ $\text{Cu}^{2+}$ .....  | 27        |
| 4.3.1    | Kvantifikace signálů $[\text{Ter}]^{o+}$ a $[\text{Ter}+\text{H}]^+$ .....                              | 29        |
| 4.3.2    | Terkonazol v přítomnosti Zn iontů .....   | 31        |
| 4.4      | URČENÍ STABILITY PREKURZORŮ $[\text{Ter}+\text{H}]^+$ , $[\text{CuTer}]^+$ , $[\text{CuTerCl}]^+$ ..... | 32        |
| 4.5      | STRUKTURA FRAGMENTŮ .....   | 35        |
| 4.5.1    | Struktura fragmentu prekurzoru $[\text{TerH}]^+$ .....  | 35        |
| 4.5.2    | Struktura fragmentů prekurzoru $[\text{CuTer}]^+$ .....   | 36        |
| 4.5.3    | Struktura fragmentů $[\text{CuTerCl}]^+$ .....  | 37        |
| 4.6      | VLIV PH NA TVORBU KOMPLEXŮ.....   | 38        |
| <b>5</b> | <b>ZÁVĚR</b> .....  | <b>41</b> |

|   |                          |    |
|---|--------------------------|----|
| 6 | POUŽITÁ LITERATURA ..... | 42 |
|---|--------------------------|----|

## Seznam zkratek

|                 |   |
|-----------------|---|
| AE              | Appearance energy                                 |
| CID             | Kolizí indukovaná disociace                       |
| CV              | Napětí na kapiláře                                |
| CYP             | Cytochrom P450                                    |
| CYP51           | Lanosterol 14 $\alpha$ -demethylasa               |
| CYP3A4          | Cytochrom P450 3A4                                |
| ESI             | Ionizace elektrosprejem                           |
| LC              | Kapalinová chromatografie                         |
| LogP            | Logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol/voda |
| MS              | Hmotnostní spektrometrie                          |
| MS/MS           | Tandemová hmotnostní spektrometrie                |
| NKE             | Normalizovaná kolizní energie                     |
| pK <sub>a</sub> | Disociační konstanta                              |
| S/N             | Signál ku šumu                                    |
| TLO             | Tube Lens Offset                                  |



# 1 Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo studium terkonazolu v prostředí s různou koncentrací iontů mědi a různým pH pomocí hmotnostní spektrometrie. Jednotlivými dílčími cíli bylo objasnění stechiometrie komplexů terkonazolu s ionty mědi, změření stability nejsignifikantnější komplexů terkonazolu s ionty mědi na základě kolizních experimentů s vybranou hmotou ( $m/z$ ) těchto komplexů, zjištění vlivu koncentrace měďnatých kationtů na oxidačně-redukční vlastnosti terkonazolu a zjištění vlivu pH na tvorbu komplexů terkonazolu s ionty mědi.

## 1.1 Hypotézy

- Terkonazol tvoří s ionty mědi komplexy, které lze studovat pomocí hmotnostní spektrometrie.
- Model systému terkonazol a ionty mědi v plynné fázi lze využít ke studiu možných interakcí tohoto farmaka s ionty mědi, které se uvolňují z nitroděložního tělíska.
- Interakce iontů mědi s terkonazolem je ovlivněna pH prostředí.

## 2 Teoretický úvod

### 2.1 Triazolové fungicidy

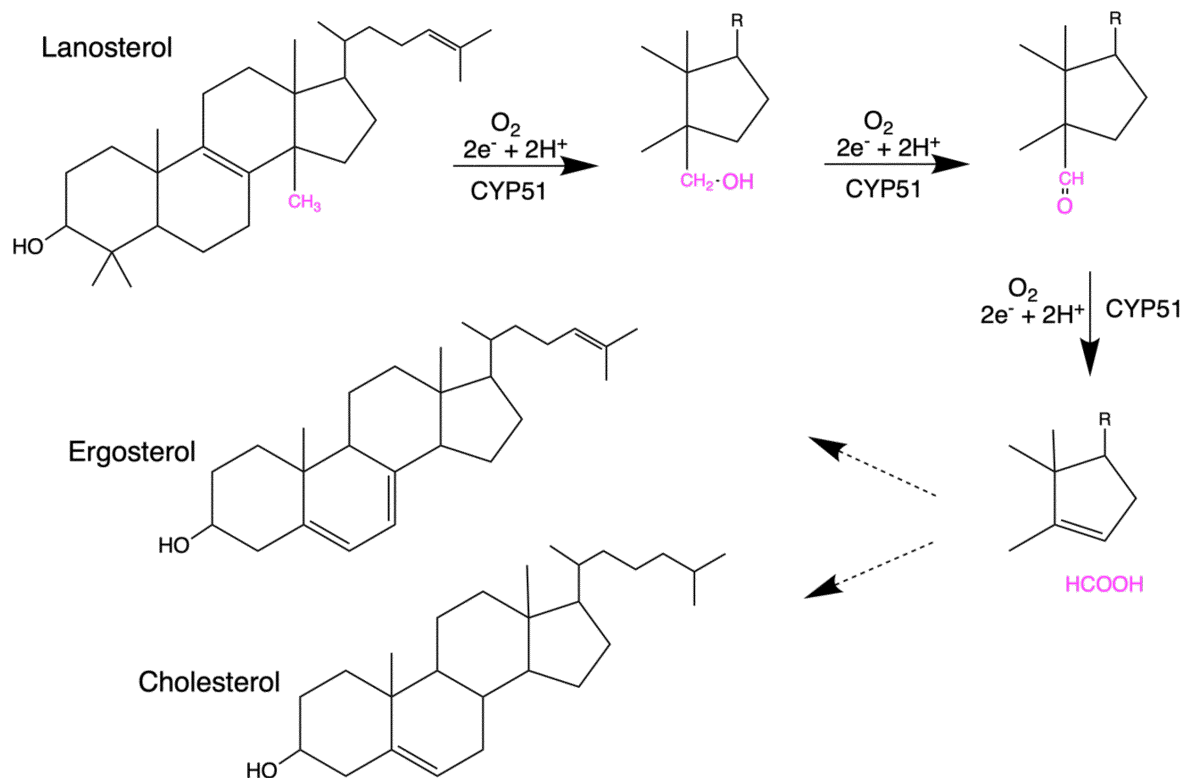
1,2,4-triazol je planární cyklická molekula obsahující nenasycený pětičlenný kruh se třemi atomy dusíku. Deriváty triazolu substituované nejčastěji na atomu N1 se používají jako látky s fungicidním účinkem, tedy látky určené k hubení hub a jejich spor v zemědělství či v medicíně<sup>1</sup>. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský uvádí, že z celkového množství 1600 tun fungicidů se v České republice za rok 2019 prodalo přes 350 tun fungicidů na bázi imidazolů a triazolů<sup>2</sup>. V medicíně jsou triazoly významnou skupinou látek používaných k léčbě plísňových infekcí a to především kandidóz<sup>3,4</sup>, které se řadí k nejčastějším nozokomiálním infekcím<sup>5</sup>.

Tyto triazolové substituenty mají nižší  $pK_a$  než samotný 1,2,4-triazol ( $pK_a$  2,09) a jsou tedy slabými bázemi<sup>6</sup>. Z toxikologického hlediska jsou významné čtyři metabolity těchto látek, a to 1,2,4-triazol, 1,2,4-triazol alanin, 1,2,4-triazol octová kyselina a 1,2,4-triazol mléčná kyselina<sup>7</sup>. V České republice není zavedena systematická kontrola výskytu těchto látek v životním prostředí<sup>8</sup>. Triazolové fungicidy využívané v medicíně se vyskytují v odpadních vodách v řádech jednotek až stovek  $ng \cdot l^{-1}$ <sup>9,10</sup>. Z odpadních vod se dále dostávají do říčních toků, jezer atd<sup>10,11</sup>. V prostředí mohou dále interagovat s dalšími polutanty (například adsorpce na povrch mikroplastů)<sup>12</sup>. Navíc se ukazuje, že např. flukonazol se nedaří dostatečně odstranit pomocí mechanicko-biologického čištění odpadních vod<sup>10,13</sup>. Triazoly mají v životním prostředí poměrně perzistentní vlastnosti, především díky jejich nízké rozpustnosti ve vodě (terkonazol  $11,6 \text{ mg} \cdot l^{-1}$ ) a vysoké hodnotě rozdělovacího koeficientu  $\log P$  (terkonazol 4,5)<sup>14</sup>. Kumulace reziduí v životním prostředí, obzvláště pak směsí aktivních látek, sebou nese riziko vzniku rezistencí<sup>9,15</sup>.

### 2.2 Mechanismus účinku

Triazolové fungicidy mají schopnost inhibovat enzym lanosterol  $14\alpha$ -demethylasu (CYP51) z rodiny cytochromů P450<sup>16,17</sup>. Tento enzym katalyzuje demethylaci lanosterolu v procesu syntézy ergosterolu (Obr. 1)<sup>18</sup>, což je důležitý sterol lipidové membrány hub, který má podobnou funkci jako cholesterol v membráně živočišné buňky. Postupné hromadění lanosterolu a narušení permeability buněčné membrány vede k inhibici buněčného růstu<sup>19</sup>.

U živočichů vzniká z lanosterolu cholesterol, který je ale primárně přijímán z potravy, a poškození živočišné buněčné membrány je tedy minimální, ovšem triazolové účinky mají na živočišnou buňku řadu vedlejších účinků, jež jsou probrány v následující kapitole<sup>18</sup>.



**Obrázek č.1** Biosyntéza ergosterolu katalyzovaná enzymem 14 $\alpha$ -demethylasou (CYP51)<sup>18</sup>

Azoly obsahující imidazolový, triazolový, nebo tetrazolový kruh se vážou v aktivním místě tohoto enzymu jako šestý axiální ligand na atom železa v hemu. Dochází tak k blokadě aktivního místa a koordinačně kovalentní vazba mezi dusíkem a železem navíc brání redukcí atomu Fe<sup>3+</sup><sup>16,20</sup>. Oproti polyenovým antimykotikům, které způsobují perforaci buněčné stěny hub<sup>21</sup>, jsou triazolová chemoterapeutika méně toxická<sup>22</sup>.

### 2.3 Vedlejší účinky

Koordinačně kovalentní vazba mezi atomem dusíku a železa ale není specifická pouze pro zmíněnou demethylasu a k inhibici může docházet i u dalších enzymů z rodiny CYP<sup>23</sup>. Kromě demethylasy inhibují triazoly stejným způsobem např. aromatasu, která v aktivním centru rovněž obsahuje hem, a která katalyzuje přeměnu androgenních prekurzorů androstenedionu, testosteronu a 16 $\alpha$ -hydroxy testosteronu na estrogení látky estron, estradiol a estriol<sup>24,25</sup>. Díky

tomu se některé triazoly využívají v léčbě hormonálně dependentního karcinomu prsu<sup>26</sup>. Dále inhibují např. enzym CYP3A4, významný detoxifikační enzym, který je navíc spjatý s metabolismem testosteronu<sup>27</sup>.

Triazoly lze označit za potenciální endokrinní disruptory, protože inhibují enzymy CYP450 účastnící se metabolismu steroidních hormonů<sup>23</sup>, a navíc se některé triazoly chovají jako ligandy jaderných receptorů<sup>28</sup>. Bylo prokázáno, že zrní ošetřená triazolovými fungicidy ohrožuje reprodukční cyklus hospodářských zvířat, protože tyto látky přijímané v potravě narušují zvířatům hladiny steroidních hormonů<sup>29</sup>. Rajčatům postřík s triazoly snižuje v listech obsah chlorofylu a i b, zpomaluje růst listů a stonků a způsobuje oxidativní stres. Svůj podíl na tom ale může mít i interakce triazolů s kationty živin v půdě a tedy omezený příjem nutrientů způsobující chřadnutí rostliny<sup>30</sup>. Jiné experimenty naopak poukazují na protektivní roli triazolů při stresových experimentech s rajčaty<sup>31</sup>.

Toxikologické studie triazolových fungicidů na modelových organismech jako dánío pruhované (*Brachydanio rerio*) prokázaly jejich imunotoxicitu<sup>32</sup>, reprodukční toxicitu<sup>33</sup>, teratogenitu, kardiotoxicitu<sup>34</sup> a neurotoxicitu<sup>35</sup>. Ve směsích pak vykazují některé triazoly synergický efekt<sup>32</sup>.

## 2.4 Interakce kovů s triazoly

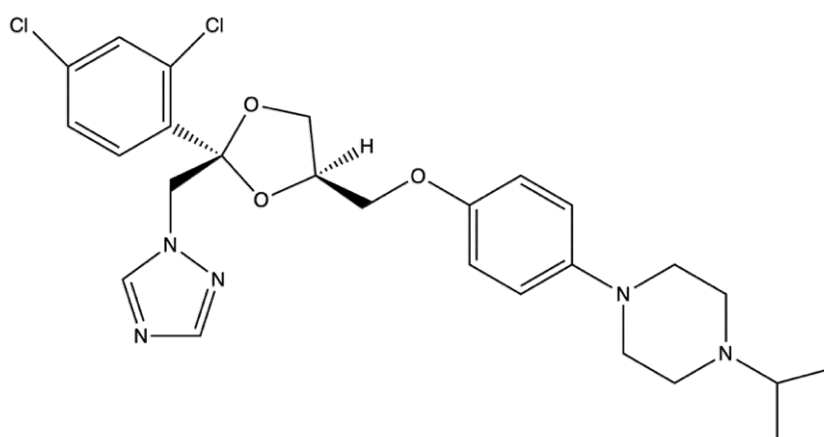
Koordinačně kovalentní vazba mezi atomem N-4 molekuly triazolu a přechodnými kovy, která je podstatou vazby triazolů do aktivního centra řady enzymů, umožňuje v případě volných iontů kovů vznik stabilních komplexů<sup>36,37</sup>. V závislosti na struktuře molekuly triazolu může tato vazba vzniknout i mezi atomem N-2, případně pomocí  $\pi$  elektronů benzenového kruhu. Komplex může být dále stabilizován např. interakcí kovu s kyslíkem z deprotonované hydroxylové skupiny<sup>37,38</sup>. Studium takovýchto komplexů umožňuje metoda MS/MS (tandemová hmotnostní spektrometrie) zkombinovaná s kvantově mechanickými výpočty, díky kterým můžeme popsat strukturu komplexů a na základě fragmentačních reakcí vypočítat tzv. appearance energy (AE) jednotlivých komplexů<sup>37</sup>. AE je hodnota nejnižší nutné energie, kterou je potřeba dodat atomu nebo molekule k fragmentaci vedoucí ke vzniku iontu, a vypovídá tedy o stabilitě dané molekuly, v tomto případě komplexu<sup>39</sup>.

Takto vzniklé komplexy kovů s triazoly mohou mít odlišné vlastnosti jako je toxicita nebo mobilita než samotné triazoly, což může být nebezpečné jak pro člověka, tak pro životní prostředí<sup>40,41</sup>. Interakce triazolů byla studována mimo jiné s ionty mědi. Ionť mědi se

v komplexech s triazololy může vyskytovat v oxidačním stavu  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Cu}^+$ , přičemž oxidační stav  $\text{Cu}^{2+}$  bývá v komplexu stabilizován dvěma způsoby. Buďto se molekula ligandu (triazol) vyskytuje v komplexu zpravidla čtyřikrát nebo i vícekrát, čímž dochází k sterickému bránění redukce atomu mědi, nebo je stav  $\text{Cu}^{2+}$  stabilizován záporným nábojem ligandu (např. deprotonovaný triazol)<sup>38,42</sup>. Měď je jednak polutantem životního prostředí, ale především se dříve používala jako fungicid, a to zejména ve vinařství, což vedlo ke kontaminaci půd na vinicích. Studie z roku 2008 zaměřená na půdu z šesti českých a moravských vinogradů prokázala nadlimitní množství mědi oproti platné legislativě ve všech zkoumaných lokalitách kromě jedné. Aplikace triazolových fungicidů v takovém prostředí tedy může nést různá ekotoxikologická rizika<sup>43</sup>. Jedním z běžně používaných fungicidů je penkonazol, který v komplexu s ionty mědi vykazuje vyšší afinitu k půdním částicím. Tímto způsobem může docházet ke kumulaci těchto polutantů v půdě<sup>41</sup>. Komplex penkonazolu s ionty  $\text{Cu}^{2+}$  navíc významně zvyšuje inhibici aromatasu oproti samotnému penkonazolu nebo  $\text{Cu}^{2+}$  iontům<sup>40</sup>.

## 2.5 Terkonazol

Jedním z triazolových fungicidů je i 1-(4-{[2-(2,4-dichlorofenyl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy}fenyl)-4-isopropylpiperazin neboli terkonazol (Obr. 2), který se používá k léčbě vulvovaginálních infekcí způsobených kvasinkami rodu *Candida*<sup>4</sup>. Kandidóza postihuje alespoň jednou za život až 75 % žen na celém světě a u 50 % žen dochází k recidivě. Po skupině bakteriálních infekcí je kandidóza druhým nejčastějším typem vaginální infekce a přibližně každá pátá žena o infekci ani nemusí vědět díky asymptomatickému průběhu<sup>44</sup>.



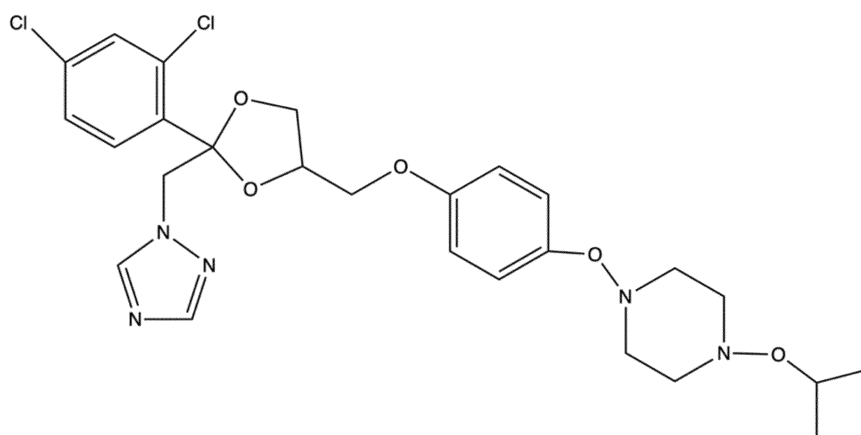
Obrázek č.2 Strukturní vzorec terkonazolu

Výhodou terkonazolu je, že terapeutické dávky jsou účinnější než příbuzný flukonazol<sup>45</sup>. Léčivo se podává lokálně v podobě krému nebo čípku a jeho používání bylo schváleno v roce 1987 americkým úřadem Food and Drug Administration (FDA). Jeho anatomicko-terapeuticko-chemický kód je G01AG02<sup>14</sup>. Kromě toho má terkonazol trypanocidní účinky a mohl by se tak používat např. k léčbě Chagasovy choroby rozšířené především v Latinské Americe<sup>46</sup>. Pokud by se podařilo pomocí vhodných surfaktantů zvýšit jeho rozpustnost ve vodném prostředí, a tedy i jeho biologickou dostupnost, mohl by se terkonazol používat k léčbě očních infekcí<sup>47,48</sup>. Hodnota LD<sub>50</sub> (orální podání, krysa) terkonazolu se pohybuje mezi 849 až 1741 mg.kg<sup>-1</sup>. Biologický poločas rozpadu je 6,9 hodin<sup>14</sup>. Terkonazol lze stanovit např. micelární kapalinovou chromatografií v krevní plazmě<sup>49</sup> nebo pomocí LC/MS/MS metody v jaterní a svalové tkáni kuřat<sup>50</sup>.

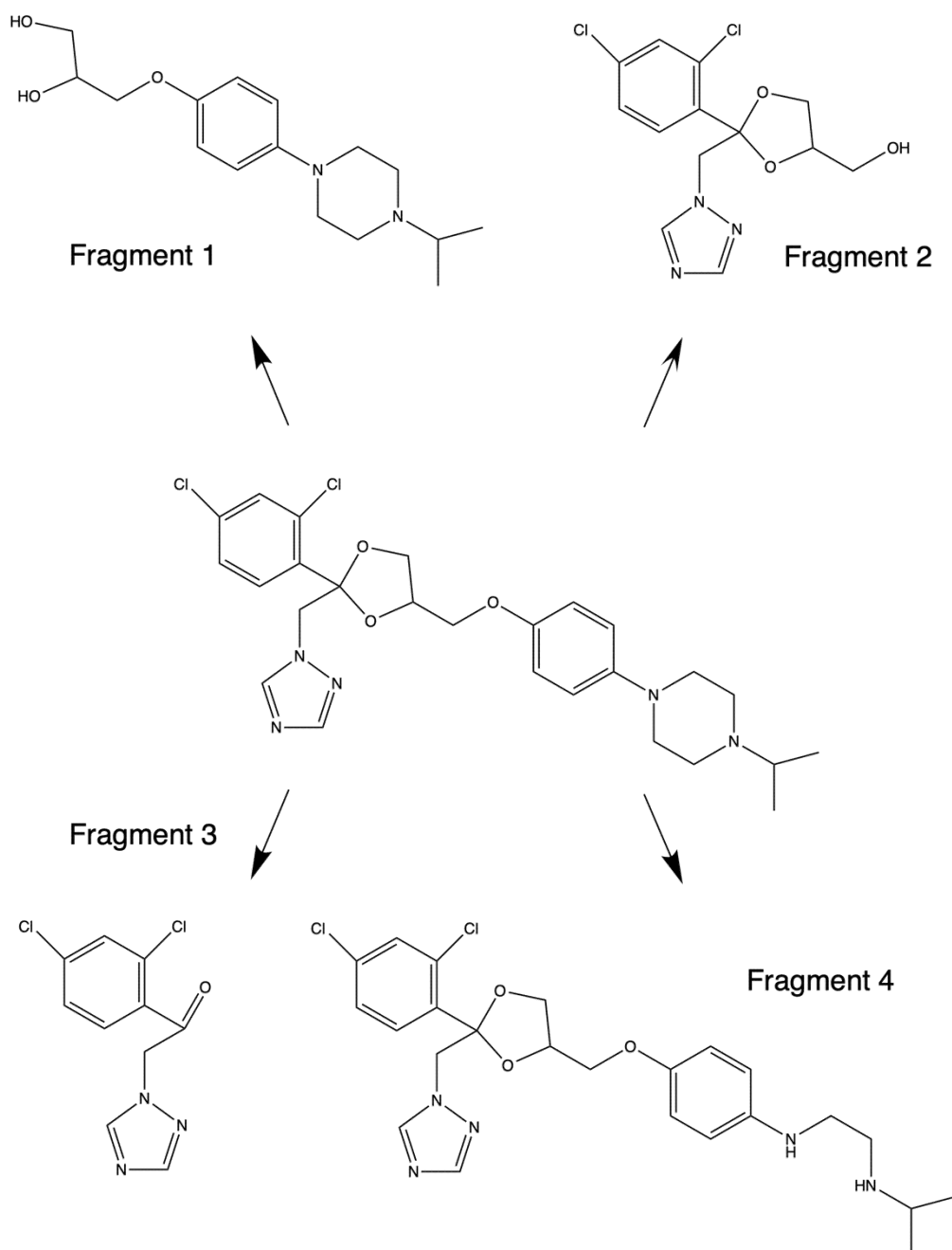
## 2.6 Fyzikálně-chemické vlastnosti terkonazolu

Terkonazol je krystalická bílá látka s teplotou tání 126,3 °C<sup>14</sup>. Ačkoliv obsahuje terkonazol dvě chirální centra, existují díky *cis* konfiguraci dichlorfenyl skupiny a vodíku na dioxolanu pouze dva enantiomery této látky. Jejich separaci lze provést pomocí enantiosektivní kapilární elektroforézy<sup>51,52</sup>.

Terkonazol je stabilní v bazickém a neutrálním prostředí a nepodléhá termodegradaci. Naopak nestabilní je v kyselém vodném prostředí a při oxidativních podmínkách, při kterých může terkonazol podléhat N,N-oxidaci (Obr. 3). V kyselém prostředí se terkonazol rozpadá minimálně na čtyři degradační produkty, které byly popsány pomocí metod MS/MS a NMR (Obr. 4 na str. 14)<sup>53,54</sup>.



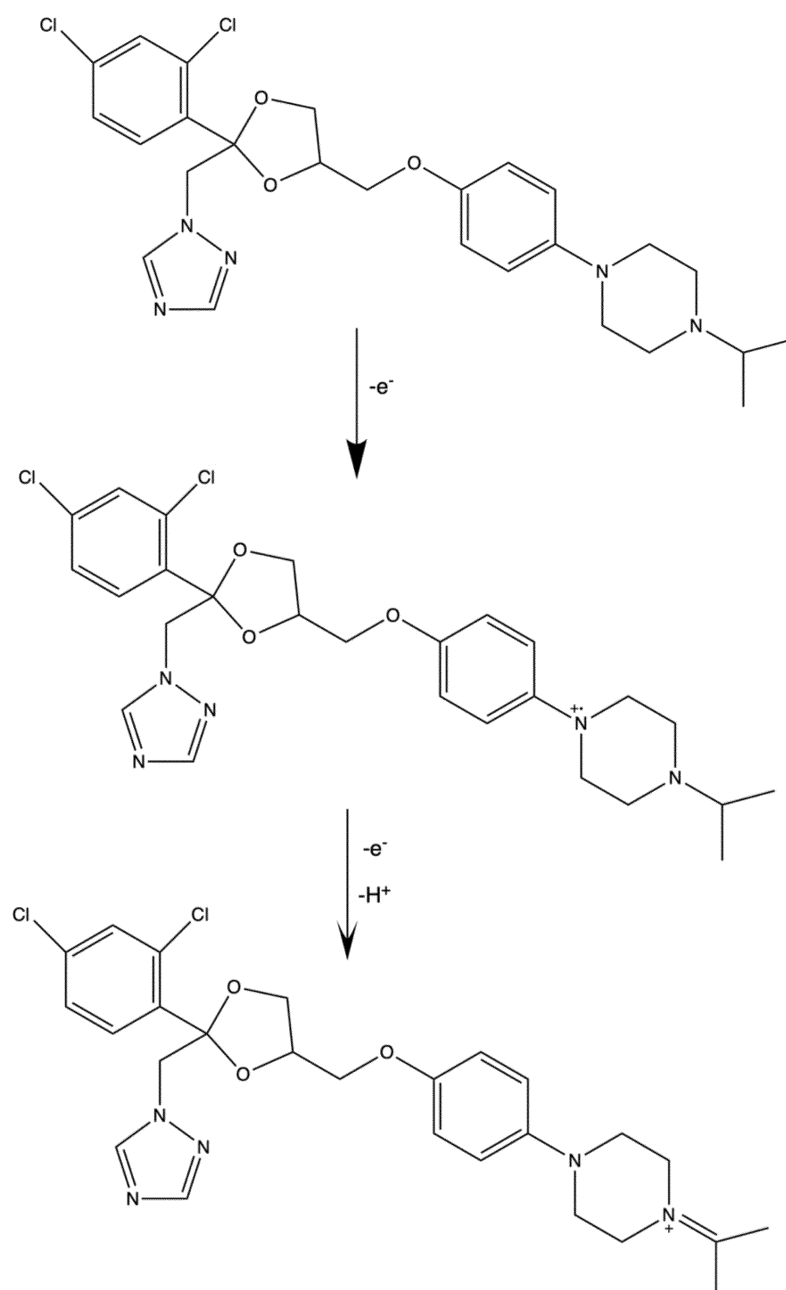
**Obrázek č. 3** N,N-dioxid terkonazolu vznikající při oxidativních podmínkách<sup>53</sup>



**Obrázek č. 4** Čtyři fragmenty terkonazolu vznikající v kyselém prostředí<sup>53</sup>

Dále terkonazol podléhá degradaci účinkem UV záření. V pevné formě je terkonazol stabilní, ale jeho roztok podléhá fotolýze během několika maximálně desítek minut. Fotolýzou mohou vznikat čtyři degradační produkty, kdy se z terkonazolu jako radikál odštěpuje jeden nebo i oba atomy chloru. Dechlorace probíhá přednostně na orto pozici. Čtvrtým degradačním produktem je monochlorovaná molekula, u které dochází ke vzniku vazby mezi aryl radikálem a triazolem po odštěpení chloru. Tyto degradační fragmenty vykazují dráždivost pro oko, a znemožňují tak používat roztok terkonazolu pro léčbu očních infekcí<sup>54</sup>.

Pomocí diferenční pulzní voltametrie bylo zjištěno, že u neprotonované formy terkonazolu dochází k oxidaci, a to na atomu dusíku piperazinového kruhu (Obr. 5). V prvním kroku oxidace dochází k odevzdání jednoho elektronu a k vzniku radikál-kationtu. Poté probíhá deprotonizace následovaná odevzdáním druhého elektronu. Vzniká tak kvartérní Schiffova báze. Poté se může molekula hydrolyticky štěpit na aceton a sekundární amin. V kyselém prostředí je radikál-kation stabilizován a může dojít i ke zpětné redukci na terkonazol<sup>55</sup>.



**Obrázek č. 5** Mechanismus oxidace terkonazolu<sup>55</sup>



## 2.7 Interakce iontů mědi s terkonazolem

Rizikovými faktory kandidózy jsou především těhotenství, cukrovka, užívání hormonální antikoncepce nebo předchozí užívání antibiotik<sup>56</sup>. Statisticky je také výskyt vulvovaginální kandidózy vyšší u žen se zavedeným nitroděložním tělískem<sup>57,58</sup>. Důvodem je tvorba patogenního biofilmu na povrchu tělíška, který komplikuje proces léčby či přirozené obrany organismu<sup>59</sup>. Pokud tedy žena se zavedeným tělískem trpí vaginální kvasinkovou infekcí, lékař ji může předepsat terkonazol. Ovšem mechanismus některých typů nitroděložních tělísek spočívá v uvolňování iontů mědi, které by mohly ve vaginální oblasti s terkonazolem interagovat. Jak bylo popsáno výše, triazoly mění v komplexech s kovy své vlastnosti jako je mobilita nebo toxicita<sup>40,41</sup>, a tak by komplexy terkonazolu s ionty mědi mohly představovat riziko vedlejších účinků či ovlivnit účinnost léčby. Interakce iontů mědi a terkonazolu nebyla dosud prostudována.

Terkonazol se na trhu vyskytuje ve třech lékových formách, a to v podobě čípků, obsahujících 80 mg terkonazolu, a krému obsahujícího 0,4 % nebo 0,8 % aktivní látky. K zavedení jedné dávky krému se používá aplikátor, který obsahuje 5 g krému, a tedy 20 nebo 40 mg terkonazolu. Nejnižší uváděná hodnota absorpce terkonazolu je 5 % a v organismu se terkonazol téměř z 95 % váže na proteiny<sup>14,60</sup>. V případě aplikace jednoho čípku by se tedy množství volné formy terkonazolu ve vaginální oblasti pohybovalo okolo 200 µg. V případě 0,4% a 0,8% krému byl pak volná forma představovala okolo 50 a 100 µg této látky. Tato volná forma by tak mohla tvořit komplexy s ionty mědi.

Vznik a vlastnosti komplexu by mohla ovlivnit případná oxidace terkonazolu způsobená samotnými ionty  $\text{Cu}^{2+}$  (Obr. 5 na str. 16) nebo reaktivními formami kyslíku vznikajících v důsledku Fentonovy reakce v přítomnosti iontů tohoto kovu<sup>61</sup>. Fentonova reakce navíc některé triazoly účinně degraduje v časovém úseku několika minut, a tak by komplexy s mědi mohly tvořit i fragmenty terkonazolu<sup>62</sup>. Oxidaci terkonazolu způsobenou ionty mědi lze simulovat pomocí ESI-MS/MS experimentů (ionizace elektrosprejem), kde je v prostředí elektrospreje možné generovat ionty  $\text{Cu}^{2+}$  v plynné fázi z vodného roztoku těchto iontů<sup>63</sup>.

Nelze opomenout, že oproti děloze, kde se pH pohybuje okolo 7<sup>64</sup>, je vaginální pH díky přítomnému mikrobiomu mírně kyselé<sup>65</sup>, a tedy i pH může hrát v tomto procesu roli. Lokální léčba kandidóz pomocí triazolových fungicidů navíc může vaginální pH ještě mírně snížit<sup>66</sup>.

Studium komplexů terkonazolu s mědi má význam i z pohledu elektrochemie, kde se komplexy s kovy mohou využít k detekci triazolů právě pomocí signálu atomu kovu<sup>55,67</sup>.

## 2.8 Nitroděložní tělíška uvolňující měď

Nitroděložní tělíško je celosvětově jedním z nejpoužívanějších typů antikoncepce<sup>68</sup> a podle dat Světové zdravotnické organizace především v rozvojových zemích<sup>69</sup>. Jedním z používaných typů je tělíško ve tvaru T s měděným drátkem, které se zavádí do děložní dutiny. Tělíško má obvykle povrch o velikosti 220 až 380 mm<sup>2</sup>, ovšem neplatí, že s velikostí povrchu by rostla jeho účinnost<sup>70</sup>. Tento typ antikoncepce vykazuje vysokou spolehlivost a to po dobu až několika let<sup>71</sup>. V minulosti byla nitroděložní tělíška spojována se závažnými problémy jako pánevní zánětlivá nemoc, mimoděložní těhotenství, infertilita nebo sepse<sup>72</sup>, což zřejmě dodnes ovlivňuje míru jejich užívání, i když jsou dnes již tato rizika minimální a tělíška jsou lékaři považována za bezpečná<sup>73</sup>.

Mechanismus účinku spočívá v uvolňování iontů mědi, čímž dochází ke snížení pohyblivosti spermií<sup>74,75</sup> a k indukci zánětlivých a spermicidních reakcí v endometriu<sup>76,77</sup>. Do dělohy se uvolňují jednotky až desítky µg iontů za den<sup>78,79</sup>. V prvním měsíci po zavedení může výjimečně docházet k vyššímu uvolňování<sup>70</sup>. To je často provázeno bolestmi, nevolnostmi a krvácením, a proto jsou vyvíjena tělíška s co nejnižším prvotním vychýlením v uvolňování iontů<sup>80</sup>. Vedlejší efekty jako je právě bolest, zvýšená intenzita krvácení při menstruaci ale i prodloužení doby krvácení často přetrvávají i několik měsíců po zavedení, a nutí řadu žen nechat si tělíško vyjmout předčasně<sup>81</sup>. U některých uživatelék této antikoncepce prokazatelně dochází k zvyšování obsahu mědi v krvi<sup>82</sup>, protože ionty mědi mohou difundovat do krevního oběhu skrze tkáň endometria<sup>83</sup>. Zvýšená hladina mědi v krvi může vést k poškození buněk či molekul DNA, protože ionty mědi se podílejí na vzniku volných radikálů, které v organismu vyvolávají oxidativní stres<sup>61,84,85</sup>.

## 2.9 Měď v lidském organismu

Měď je esenciálním prvkem všech eukaryotních organismů. Díky svým elektron donor/akceptorovým vlastnostem představuje redoxní centrum řady enzymů. V mitochondriích se účastní dýchacího řetězce jako kofaktor cytochrom c oxidasy, neboli kotveného komplexu IV<sup>86</sup>. Je kofaktorem tyrosinkinasy zodpovědné za tvorbu melaninu<sup>87</sup>, a zároveň hraje roli i při oxidaci a následovném blednutí tohoto pigmentu<sup>88</sup>. Cu-dependentní enzymy zahrnují dále např. superoxididismutasu, která rozkládá nebezpečný superoxid radikál<sup>89</sup>, lisyloxidasu zodpovědnou za syntézu kolagenu, a řadu enzymů regulujících syntézu neurotransmiterů<sup>90</sup>.

Ceruloplazmin je plazmatický protein vázající až 95 % veškeré mědi v krevní plazmě, který se mimo jiné podílí na oxidaci železnatých iontů, a přispívá tak udržování optimální hladiny iontů železa v krvi. Pouze železité ionty totiž mohou být dále transportovány transferinem. Nedostatek mědi v organismu tak může zapříčinit až anémii<sup>90</sup>. Nadbytek mědi je ale pro organismus také kritický, protože ionty mědi zvyšují v těle obsah volných radikálů, které způsobují oxidativní stres a poškozují tak buněčné membrány, molekuly DNA nebo mitochondrie<sup>84,85</sup>. Lidé postižení dědičným metabolickým onemocněním označovaným jako Wilsonova choroba trpí v důsledku deficitu enzymu transportující měď hromaděním mědi v játrech a mozku, což může mít za následek vážné neurologické poruchy a poškození jater<sup>91</sup>.

## 2.10 Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem a iontovou pastí

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, jejíž princip spočívá v převedení molekul vzorku do formy iontů v iontovém zdroji a jejich následné separaci v hmotnostním analyzátoru. Každý iont je charakterizován jeho poměrem hmotnosti ku náboji  $m/z$ , který ovlivňuje pohyb iontu v magnetickém nebo elektrickém poli analyzátoru. Hmotnostní analyzátor a detektor pracují v režimu vysokého vakua. Jako záznam získáváme závislost intenzity iontů (absolutní či relativní) na zmíněném  $m/z$ <sup>92</sup>.

Zatímco v tvrdých ionizačních metodách dochází často pro nadbytek vnitřní energie k fragmentaci iontu, měkké ionizační techniky umožňují šetrnější způsob ionizace. Mezi tyto měkké ionizační techniky řadíme např. ionizaci elektrosprejem probíhající za atmosférického tlaku. Tato technika je vhodná pro širokou škálu látek, obzvláště pak polární molekuly nebo ionty a molekuly s vysokou molekulovou hmotností jako jsou biopolymery. Vzorek je do ionizační komory přiváděn spolu s rozpouštědlem křemennou kapilárou, na jejíž konec je vkládáno vysoké napětí okolo 3 až 5 kV. Pomocí napětí a nebulizačního plynu (např. dusík) je vzorek převeden na malé kapičky, které díky vkládanému napětí nesou souhlasný náboj. Odpařováním rozpouštědla narůstá v kapičkách elektrostatické odpuzování těchto nábojů, což vede až ke Coulombické explozi a ke vzniku samostatných jedno- i vícenásobně nabitých iontů jako jsou protonované ionty  $[M+H]^+$  a adukty s ionty kovů jako např.  $[M+Na]^+$ <sup>93</sup>.

Ionty jsou následně přiváděny do analyzátoru, kterých je několik typů lišící se svým principem a rozlišením. Iontová past se řadí mezi analyzátory s nízkým rozlišením, jejíž

mechanismus spočívá v zadržování a vypuzování iontů uvnitř prostoru prstencové elektrody. Toto zadržování iontů se řídí jejich  $m/z$  a hodnotou vkládaného napětí jak na prstencovou elektrodu, tak na dvě koncové elektrody uzavírající prostor pasti. Změnou napětí jsou ionty s určitým  $m/z$  vypuzeny a pokračují na detektor. Iontová past má sice nízké rozlišení, na druhou stranu má nižší pořizovací náklady a umožňuje tandemové uspořádání. MS/MS se nejčastěji provádí pomocí kolizí indukované disociace (CID). Při tomto procesu je v iontové pasti pomocí vhodného napětí udržován prekurzorový iont o vybraném  $m/z$  a zároveň je přiváděn kolizní plyn (helium, argon), který se sráží s molekulami prekurzoru, a těmito srážkami dochází k fragmentaci a vzniku produktových iontů, které následně putují na detektor<sup>94</sup>.

## Experimentální část

### 3 Materiál a metody

#### 3.1 Použité chemikálie

|                   |   |
|-------------------|---|
| Terkonazol        | (analytický standard, Sigma Aldrich, Švýcarsko) |
| CuCl <sub>2</sub> | (99 %, Sigma Aldrich, Česká republika)          |
| ZnCl <sub>2</sub> | (99 %, Sigma Aldrich, Česká republika)          |
| Kyselina mravenčí | (85 % p.a., Penta, Česká republika)             |
| Ethanol           | (99,9 %, VWR Chemicals, Francie)                |
| Deionizovaná voda | (18mΩ, Milipore, MA, USA)                       |

#### 3.2 Použité přístroje a programy

Hmotnostní spektrometr s iontovou pastí (LCQ Advantage, Thermo Fischer Scientific. Inc., Waltham, MA, USA)

Software pro ESI-MS/MS: Thermo Xcalibur Tune Plus 2.0 (Thermo Fischer Scientific. Inc.)

Software pro vyhodnocování: Thermo Xcalibur 3.0 Qual Browser (Thermo Fischer Scientific. Inc.)

pH-metr: CyberScan PC 5500 (Eutech instruments)

#### 3.3 Příprava roztoků

Roztok terkonazolu byl připraven rozpuštěním v ethanolu, z kterého byl následně připraven zásobní roztok o koncentraci  $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , který byl uchováván při teplotě  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ . Z tohoto zásobního roztoku byl dále připraven pracovní roztok o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , který byl uchováván při teplotě  $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ . CuCl<sub>2</sub> a ZnCl<sub>2</sub> byly samostatně rozpuštěny v deionizované vodě a dále z nich byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Poté byly

připraveny pracovní roztoky obou látek o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$  a  $1 \cdot 10^{-5}$  mol.dm<sup>-3</sup>. Tyto roztoky byly uchovávány při teplotě -4 °C.

Ve všech vzorcích byly při experimentech vždy použity obě uvedená rozpouštědla (voda, ethanol) v poměru 1:1, aby byly zachovány stejné podmínky měření. Terkonazol rozpuštěný v ethanolu byl tedy smíchán se stejným objemem vodného roztoku příslušných iontů, či kyseliny mravenčí, případně pouze s deionizovanou vodou, a to těsně před zavedením do křemenné kapiláry.

### 3.4 Podmínky měření

Měření ESI-MS probíhalo v pozitivním módu v rozsahu  $m/z$  od 50 do 2000. Při CID experimentech byl rozsah upraven na  $1/3$   $m/z$  prekurzorového iontu až 1000  $m/z$ . Spektra byla měřena dvě minuty, pokud není uvedeno jinak. Vzorek byl přiváděn pomocí automatického dávkovače křemennou kapilárou průtokem 0,5 ml.hod<sup>-1</sup> z Hamiltonovy stříkačky. Jako nebulizační plyn byl použit dusík, jako kolizní plyn helium. Průtok pomocného a ochranného plynu byl 15 a 20 arbitrárních jednotek, napětí ve spreji bylo 4,5 kV, teplota kapiláry 180 °C. Parametry CV (Capillary Voltage) a TLO (Tube Lens Offset) byly optimalizovány pro každý ion zvlášť. Experimenty byly prováděny v plynné fázi v dle metody publikované v článku „Theoretical insight into the stabilization of triazole fungicides via their interactions with dications“<sup>37</sup>.

### 3.5 MS/MS experimenty a stanovení AE

Stabilita iontu terkonazolu a jeho komplexů s mědí byla určena pomocí fragmentačních reakcí. Fragmentace byla provedena pomocí kolizí indukované disociace. Při fragmentačních reakcích byla koncentrace terkonazolu  $5 \cdot 10^{-5}$  mol.dm<sup>-3</sup> a koncentrace CuCl<sub>2</sub>  $5 \cdot 10^{-4}$  mol.dm<sup>-3</sup>. MS/MS sekvence trvala 36 minut, hodnota normalizované kolizní energie (NKE) se zvyšovala po dvou minutách postupně z 0, 5, 10, 13, 15, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 35, 38, 40, 45, až na 50 %.

Použité hodnoty NKE byly poté pro vybrané prekurzorové ionty převedeny na absolutní hodnotu AE v kJ.mol<sup>-1</sup> pomocí konverzního faktoru dle metody publikované v „Energy-dependent dissociation of benzylpyridinium ions in an ion-trap mass spectrometer“<sup>95</sup> následujícím postupem. Získané body relativní intenzity prekurzorového a produktového iontu

v závislosti na rostoucí NKE byly proloženy sigmoidní křivkou. První derivací této sigmoidní funkce pro produktový iont v bodě, kde se křivky obou sigmoidních funkcí prekurzorového i produktového iontu protínají, se získala tečna protínající osu x v bodě s příslušnou hodnotou NKE. Tato hodnota NKE se následně vynásobila konverzním faktorem 7,3, viz rovnice (1). Stanovení hodnoty konverzního faktoru a kalibrace kolizní energie byla u přístroje provedena dříve pomocí fragmentace benzylypyridiniových iontů dle stejné metody zmíněné výše<sup>95</sup>.

$$AE(\text{kJ/mol}) = (7,3 \pm 0,3) \times NKE(\%) \quad (1)$$

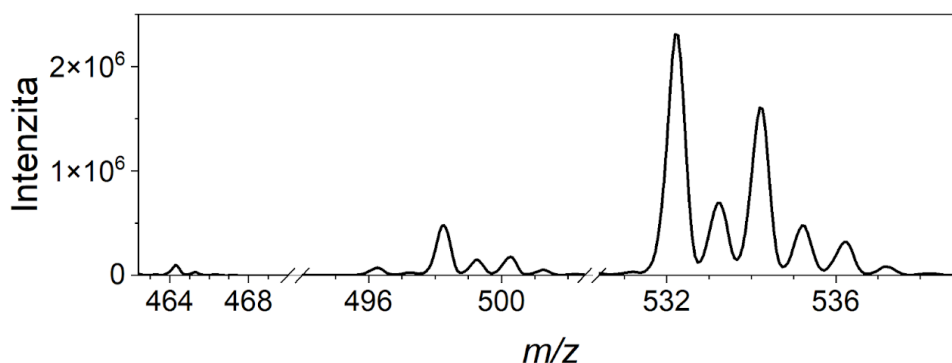
**Rovnice č.1** Rovnice pro výpočet Appearance energy prekurzorového iontu pro použitý hmotnostní spektrometr<sup>95</sup>

## 4 Výsledky a diskuse

### 4.1 ESI-MS spektrum terkonazolu

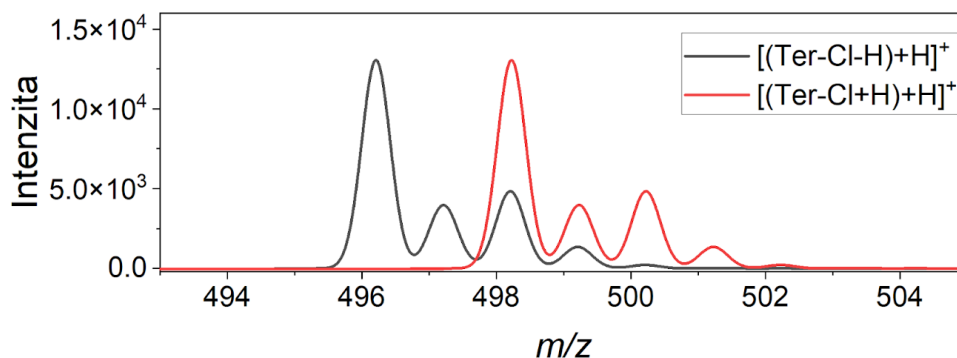
Spektrum terkonazolu v ethanolu s vodou ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) bylo měřeno 8 minut. Nejvyšší intenzitu měl signál protonovaného terkonazolu  $m/z$  532,2 (Tabulka 1 na str. 25). Signál  $m/z$  496,2 (Obr. 6) patří fragmentu  $[(\text{Ter-Cl-H})+\text{H}]^+$ , u kterého po odštěpení chloru dochází ke vzniku nové vazby mezi arylradikálem a triazolem<sup>54</sup>. Porovnáním simulovaného izotopového profilu tohoto iontu (Obr. 7 na str. 25) s výškou třetího píku ( $m/z$  498,2) v naměřeném izotopovém profilu (Obr. 6) je vidět, že naměřený profil obsahuje zároveň i signál protonovaného monochlorovaného terkonazolu  $[(\text{Ter-Cl+H})+\text{H}]^+$ , kde tato nová vazba nevzniká, a iont je o 2  $m/z$  těžší. Pík  $m/z$  498 je tedy složeným signálem, jde o první pík komplexu  $[(\text{Ter-Cl+H})+\text{H}]^+$  a zároveň o třetí pík  $[(\text{Ter-Cl-H})+\text{H}]^+$ . Signál  $m/z$  464,3 (Obr. 6) patří protonovanému terkonazolu bez obou atomů chloru  $[(\text{Ter-2Cl+2H})+\text{H}]^+$ . V dříve publikovaných studiích byly tyto dechlorované ionty označeny za produkty degradace roztoku terkonazolu účinkem UV zářením<sup>54</sup>.

Terkonazol také vytvořil dimer, který měl signál  $m/z$  1062,4, což znamená, že jedna z molekul terkonazolu se zde vyskytla v oxidované formě  $[\text{Ter}]^{\text{o}+}$ .  $[\text{Ter}]^{\text{o}+}$  je radikál-kationt vznikající odevzdáním jednoho elektronu z piperazinového kruhu (Obr. 4 na str. 16)<sup>55</sup>. Popsané ionty a jejich zastoupení ve spektru je uvedeno v Tabulce 1 na str. 25.



**Obrázek č. 6** Signály  $[(\text{Ter-2Cl+2H})+\text{H}]^+$  ( $m/z$  464,3),  $[(\text{Ter-Cl-H})+\text{H}]^+$  ( $m/z$  496,2) překrývající se se signálem  $[(\text{Ter-Cl+H})+\text{H}]^+$  ( $m/z$  498,2), a  $[\text{Ter+H}]^+$  ( $m/z$  532,2) v ESI-MS spektru terkonazolu ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) v  $\text{CH}_3\text{COH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1)





**Obrázek č.7** Simulace izotopového profilu  $[(\text{Ter-Cl-H})+\text{H}]^+$  ( $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{ClN}_5\text{O}_3$ ) a  $[(\text{Ter-Cl+H})+\text{H}]^+$  ( $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{ClN}_5\text{O}_3$ )

**Tabulka č.1** ESI-MS signály terkonazolu ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) v  $\text{CH}_3\text{COH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1)

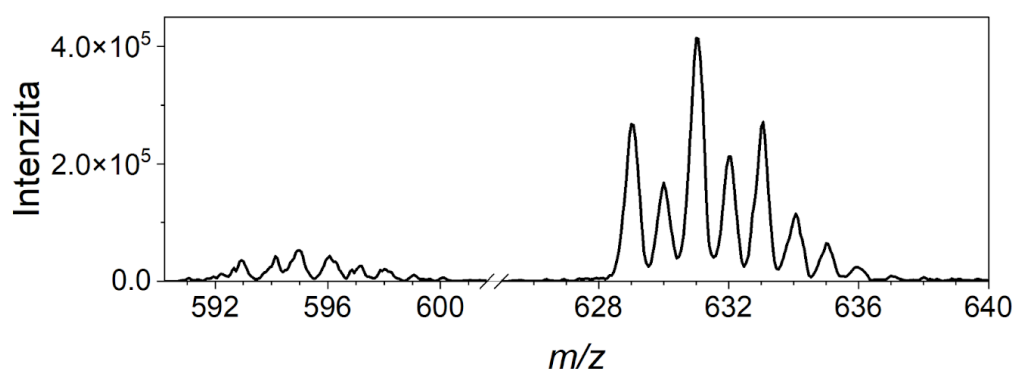
| Naměřené<br><i>m/z</i> | Vzorec                             | Relativní<br>intenzita<br>(%) | Naměřené<br><i>m/z</i> | Vzorec                                     | Relativní<br>intenzita<br>(%) |
|------------------------|------------------------------------|-------------------------------|------------------------|--|-------------------------------|
| 464,3                  | $[(\text{Ter-2Cl+2H})+\text{H}]^+$ | 3,17                          | 532,2                  | $[\text{Ter}+\text{H}]^+$                  | 100,00                        |
| 496,2                  | $[(\text{Ter-Cl-H})+\text{H}]^+$   | 2,21                          | 1062,4                 | $[(\text{Ter})(\text{Ter}^{\text{O}+})]^+$ | 5,58                          |
| 498,2                  | $[(\text{Ter-Cl+H})+\text{H}]^+$   | 18,23                         |                        |  |                               |

## 4.2 ESI-MS spektrum terkonazolu a $\text{CuCl}_2$

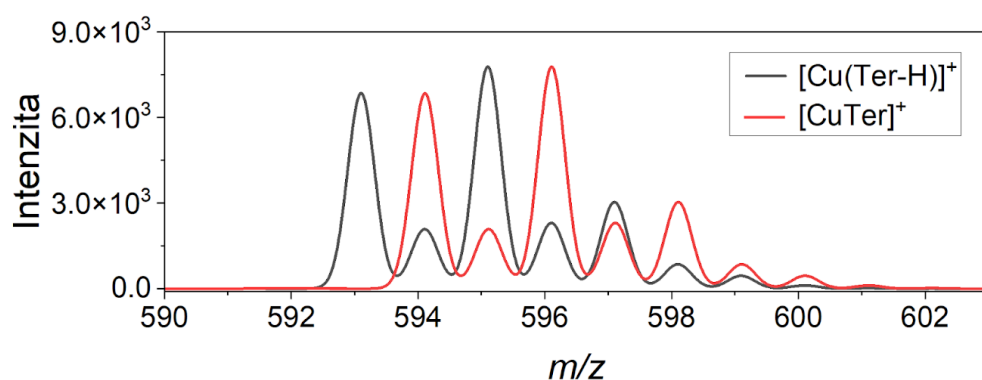
Přidáním vodného roztoku  $\text{CuCl}_2$  k terkonazolu rozpuštěného v ethanolu (výsledná koncentrace obou látek  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) došlo ke zvýšené oxidaci molekuly terkonazolu, což je patrné z intenzity  $\text{Ter}^{\text{O}+}$  (Tab. 2 na str. 27), a také ke vzniku několika dalších komplexů. Z izotopového profilu s prvním píkem  $m/z$  593,0 (Obr. 8 na str.26) je zřejmé, že zde zřejmě došlo k překrytí dvou signálů a to  $[\text{Cu}(\text{Ter-H})]^+$  ( $m/z$  593), s mědí v oxidačním stavu  $\text{Cu}^{2+}$ , a  $[\text{CuTer}]^+$  ( $m/z$  594), s mědí v oxidačním stavu  $\text{Cu}^+$ . Na naměřeném izotopovém profilu je totiž vidět, že druhý pík  $m/z$  594 je vyšší než  $m/z$  593, a stejně tak i pík  $m/z$  596 je vyšší, než by měl být podle simulace izotopového profilu  $[\text{Cu}(\text{Ter-H})]^+$  (Obr. 9 na str. 26). Pík  $m/z$  594 je tedy složeným signálem, jde o první pík komplexu  $[\text{CuTer}]^+$  a zároveň druhý pík  $[\text{Cu}(\text{Ter-H})]^+$ . Ion  $m/z$  593,0 měl ze sledovaných iontů nejnižší intenzitu, ale na základě poměru intenzity

$m/z$  593,0 a šumu v blízkém okolí byl splněn limit kvantifikace  $S/N \geq 10$ . Dále došlo ke vzniku komplexu  $[\text{CuTerCl}]^+$  ( $m/z$  629,1) (Obr. 8). Komplex  $[\text{CuTerCl}]^+$  ( $m/z$  629,1) a  $[\text{CuTer}]^+$  (594,1) byly později vybrány i pro MS/MS experimenty (kapitola 4.4 a 4.5).

Terkonazol nevytvářel oligomery s iontem mědi s významným zastoupením ve spektru, jako tomu bývá u jiných triazolů v přítomnosti tohoto kovu, a to zřejmě protože je jeho molekula větší než molekuly těchto příbuzných látek, což může ovlivňovat stabilitu takovýchto komplexů<sup>38,42</sup>. Popsané ionty a jejich zastoupení ve spektru je uvedeno v Tabulce 2 na str. 27.



**Obrázek č. 8** Signály  $[\text{Cu}(\text{Ter-H})]^+$  ( $m/z$  593,0) překrývající se se signálem  $[\text{CuTer}]^+$  ( $m/z$  594,1) a  $\text{CuTerCl}$  ( $m/z$  629,1) v ESI-MS spektru terkonazolu a  $\text{CuCl}_2$  ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) v  $\text{CH}_3\text{COH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1)



**Obrázek č. 9** Simulace izotopového profilu  $[\text{Cu}(\text{Ter-H})]^+$   $\text{Cu}(\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_3)$  a  $[\text{CuTer}]^+$   $\text{Cu}(\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_3)$

**Tabulka č.2** ESI-MS signály terkonazolu ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol.dm<sup>-3</sup>) a CuCl<sub>2</sub> ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol.dm<sup>-3</sup>) v CH<sub>3</sub>COH/H<sub>2</sub>O (1:1)

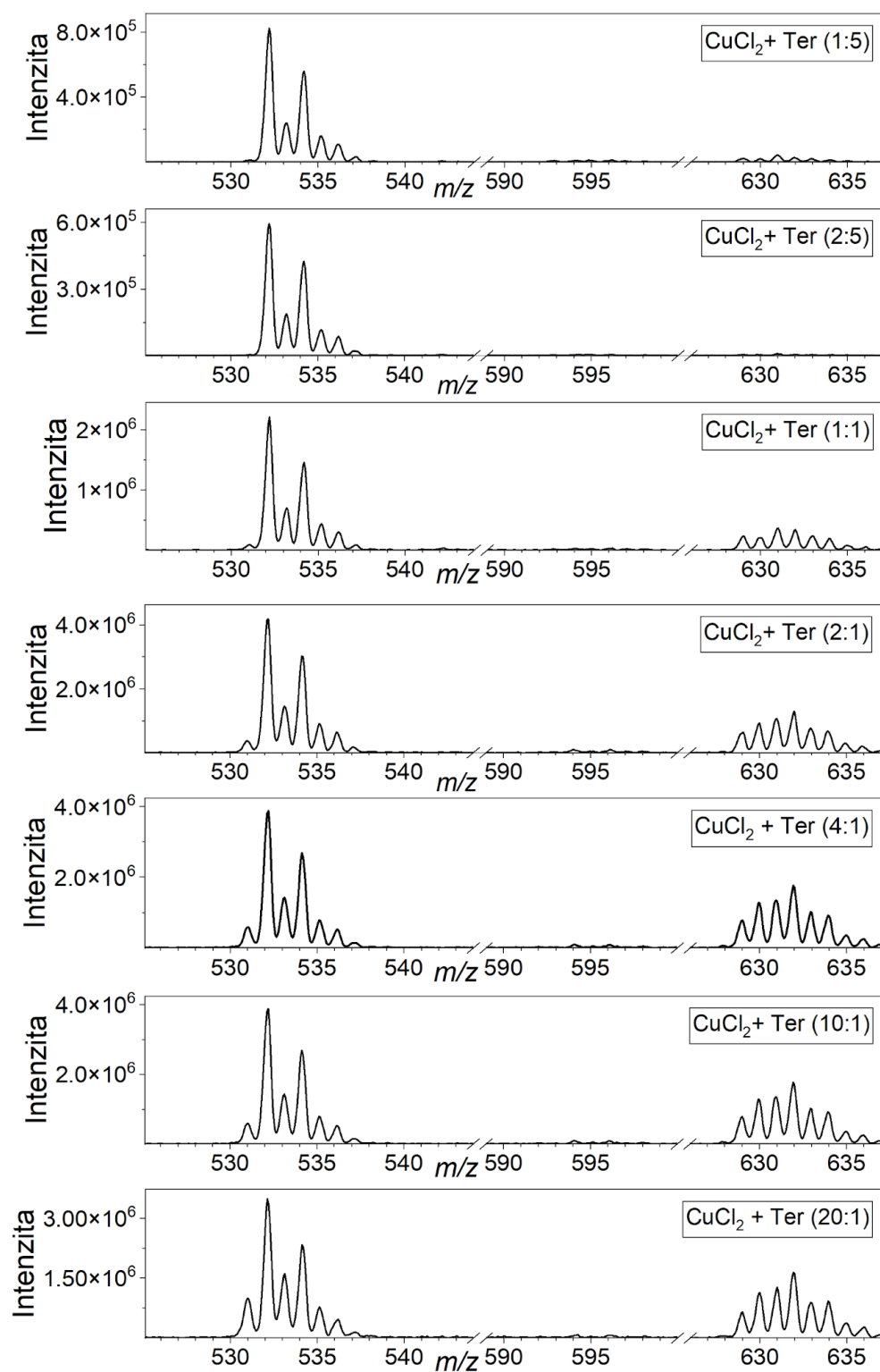
| Naměřené<br><i>m/z</i> | Vzorec                   | Relativní<br>intenzita<br>(%) | Naměřené<br><i>m/z</i> | Vzorec                                   | Relativní<br>intenzita<br>(%) |
|------------------------|--------------------------|-------------------------------|------------------------|--|-------------------------------|
| 531,2                  | Ter <sup>o+</sup>        | 2,29                          | 594,1                  | [CuTer] <sup>+</sup>                     | 1,49                          |
| 532,2                  | [Ter+H] <sup>+</sup>     | 100,00                        | 629,1                  | [CuTerCl] <sup>+</sup>                   | 9,37                          |
| 593,0                  | [Cu(Ter-H)] <sup>+</sup> | 1,24                          | 1062,4                 | [(Ter)(Ter <sup>o+</sup> )] <sup>+</sup> | 3,22                          |

### 4.3 Oxidace terkonazolu v přítomnosti iontů Cu<sup>2+</sup>

Z výsledků měření vyplynulo, že se v přítomnosti iontů Cu<sup>2+</sup> zvyšuje míra oxidace terkonazolu (Kap. 4.2). Ion Cu<sup>2+</sup> se v závislosti na přítomných ligandech v podmínkách elektrospreje běžně redukuje, zpravidla však nedochází k přímé oxidaci ligandu jako je tomu v případě terkonazolu<sup>63,96</sup>. Aby bylo možné zjistit závislost poměru intenzit oxidované [Ter]<sup>o+</sup> a protonované formy [Ter+H]<sup>+</sup> terkonazolu na koncentraci iontů Cu<sup>2+</sup>, byla provedena řada sedmi měření po třech opakování roztoku terkonazolu ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol.dm<sup>-3</sup>) a CuCl<sub>2</sub> o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$  a  $1 \cdot 10^{-3}$  mol.dm<sup>-3</sup> (Obr. 10 na str. 28). Přesný postup kvantifikace intenzit těchto iontů je popsán v následující kapitole 4.3.1 na str. 29.

Z poměru intenzit iontů [Ter]<sup>o+</sup> a [Ter+H]<sup>+</sup> (Obr. 12 na str. 30) je vidět, že ve vzorcích CuCl<sub>2</sub> a terkonazolu 1:5, 2:5 a 1:1 je intenzita oxidovaného terkonazolu v poměru k protonovanému terkonazolu průměrně 1,6 % a významně narůstá až ve vzorcích CuCl<sub>2</sub> a terkonazolu 4:1, 10:1 a 20:1 a to až na 9,3 % 14,7 % a 35,5 %.

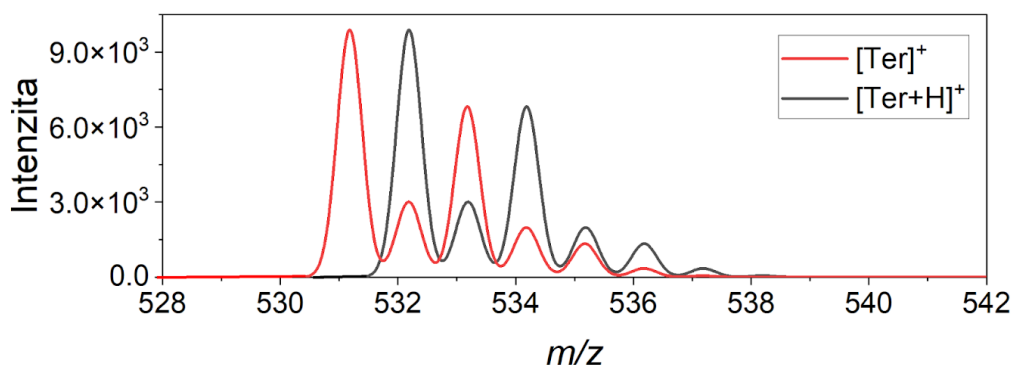
Z relativních intenzit iontů [CuTerCl]<sup>+</sup> (*m/z* 629) a [Cu(Ter-H)]<sup>+</sup> (*m/z* 593) (Obr.13 na str. 30) vyplývá, že s rostoucí koncentrací CuCl<sub>2</sub> také rostla intenzita komplexu [CuTerCl]<sup>+</sup>. Zde se terkonazol objevuje ve formě neutrálního ligandu a náboj je lokalizován na iontu Cu<sup>2+</sup> a proti-iontu Cl<sup>-</sup>. Signál [Cu(Ter-H)]<sup>+</sup> s rostoucí koncentrací CuCl<sub>2</sub> významně nerostl a limitujícím faktorem v tomto případě tedy byla koncentrace samotného terkonazolu, jež se neměnila.



**Obrázek č. 10** ESI-MS spektrum protonovaného terkonazolu [Ter+H] ( $m/z$  532) a jeho komplexů  $[\text{Cu}(\text{Ter}-\text{H})]^+$  ( $m/z$  593),  $[\text{CuTerCl}]^+$  ( $m/z$  629) s konstantní koncentrací terkonazolu ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a variabilní koncentrací  $\text{CuCl}_2$  v  $\text{CH}_3\text{COH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1)

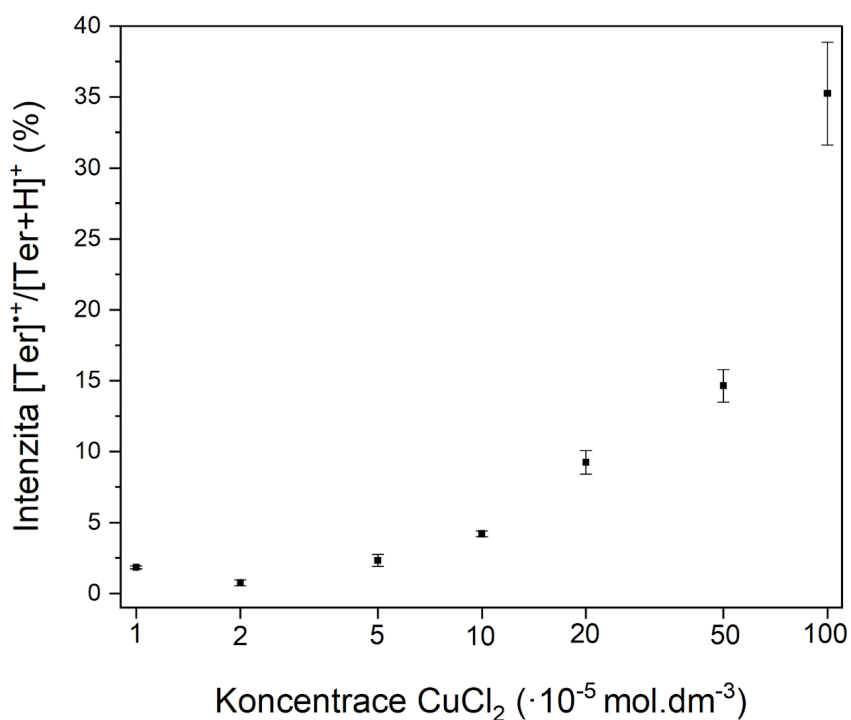
### 4.3.1 Kvantifikace signálů $[\text{Ter}]^{\text{O}+}$ a $[\text{Ter}+\text{H}]^+$

Zastoupení  $[\text{Ter}]^{\text{O}+}$  i  $[\text{Ter}+\text{H}]^+$  bylo odvozeno od intenzity píků náležících jejich nejlehčím izotopům ( $m/z$  531 a  $m/z$  532). Zatímco intenzitu prvního píku  $[\text{Ter}]^{\text{O}+}$  ( $m/z$  531) lze odečítat přímo z naměřeného spektra, k intenzitě prvního píku  $[\text{Ter}+\text{H}]^+$  ( $m/z$  532) přispívá navíc i druhý pík  $[\text{Ter}]^{\text{O}+}$ . Oxidovaná forma tedy způsobuje změnu izotopového profilu  $[\text{Ter}+\text{H}]^+$  a  $m/z$  532 je složeným signálem, jak je vidět na simulaci izotopových profilů obou iontů (Obr. 13).

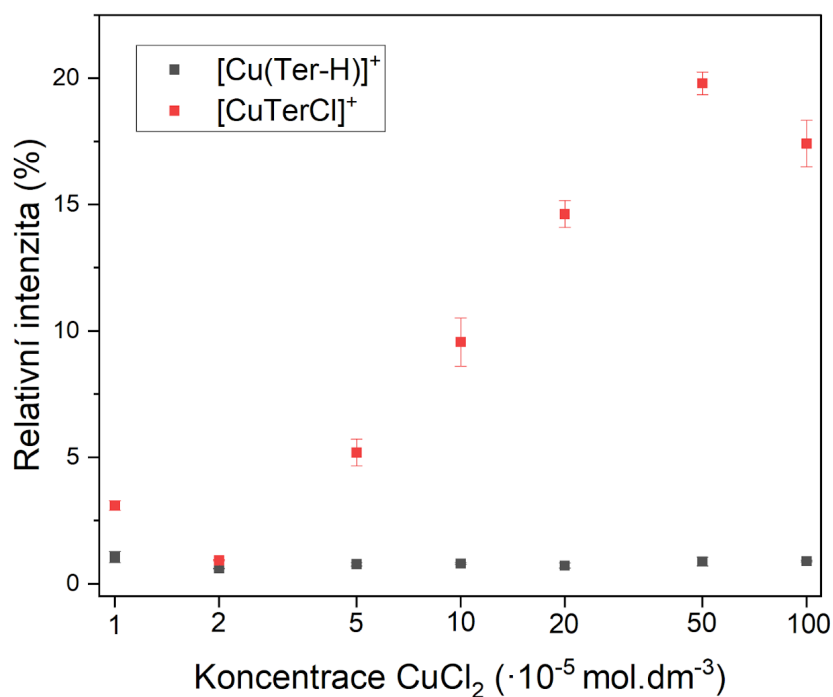


**Obrázek č. 11** Simulace izotopového profilu oxidované  $[\text{Ter}]^{\text{O}+}$  a protonované  $[\text{Ter}+\text{H}]^+$  formy terkonazolu získaná pomocí programu Thermo Xcalibur 3.0 Qual Browser

Pomocí simulace izotopového profilu  $[\text{Ter}]^{\text{O}+}$  se sumárním vzorcem  $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_3$  získané pomocí programu Thermo Xcalibur 3.0 Qual Browser lze určit, že druhý pík této molekuly má signál s 30% intenzitou svého prvního píku, protože intenzita prvního píku na příslušném izotopovém profilu je 9893,249 a druhého 3011,228. Abychom tedy v naměřených spektrech získali intenzitu pouze  $[\text{Ter}+\text{H}]^+$ , od naměřené intenzity složeného signálu  $m/z$  532 bylo potřeba odečíst 30 % intenzity signálu  $m/z$  531, tedy příspěvek  $[\text{Ter}]^{\text{O}+}$ .



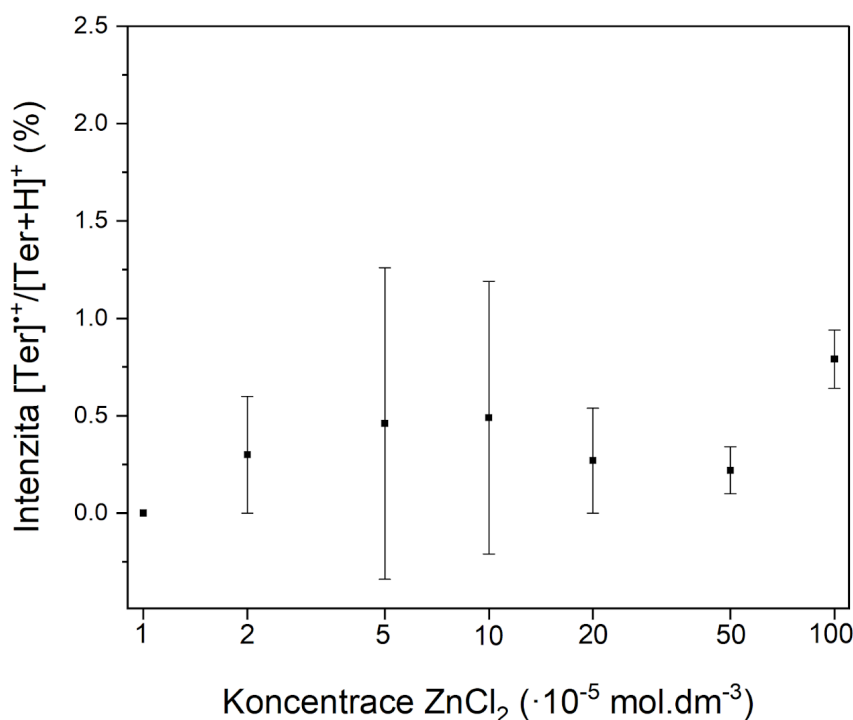
**Obrázek č. 12** Závislost poměru intenzit oxidované ku protonované formě terkonazolu na koncentraci CuCl<sub>2</sub> ve vzorku terkonazolu ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol.dm<sup>-3</sup>) a CuCl<sub>2</sub> v CH<sub>3</sub>COH/H<sub>2</sub>O (1:1)



**Obrázek č. 13** Závislost relativní intenzity iontů [Cu(Ter-H)]<sup>+</sup> ( $m/z$  593) a [CuTerCl]<sup>+</sup> ( $m/z$  629) na koncentraci CuCl<sub>2</sub> ve vzorku terkonazolu ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol.dm<sup>-3</sup>) a CuCl<sub>2</sub> v CH<sub>3</sub>COH/H<sub>2</sub>O (1:1)

### 4.3.2 Terkonazol v přítomnosti Zn iontů

Aby bylo možné objasnit roli iontů  $\text{Cu}^{2+}$  při oxidaci terkonazolu, experimenty byly analogicky provedeny se  $\text{Zn}^{2+}$  ionty. Ty mají stejné stechiometrické vlastnosti jako ionty  $\text{Cu}^{2+}$ , ale v ESI prostředí nedochází k jejich redukci. Cílem tedy bylo objasnit případný vliv iontové síly roztoku na oxidaci terkonazolu, jež je pro oba ionty totožná. Stejným postupem tedy byla provedena řada sedmi měření po třech opakování terkonazolu ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a  $\text{Zn}^{2+}$  iontů o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$  a  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a sledován signál protonovaného terkonazolu  $[\text{Ter}+\text{H}]^+$  a jeho oxidované formy  $[\text{Ter}]^{\text{o}+}$ . Pro žádnou koncentraci  $\text{ZnCl}_2$  nebyl signál oxidovaného terkonazolu vyšší než 1 % (Obr. 14). Z toho vyplývá, že oxidace terkonazolu je způsobena přítomností  $\text{Cu}^{2+}$  iontů a nikoli iontovou silou roztoku, ze kterého byl vzorek sprejován.



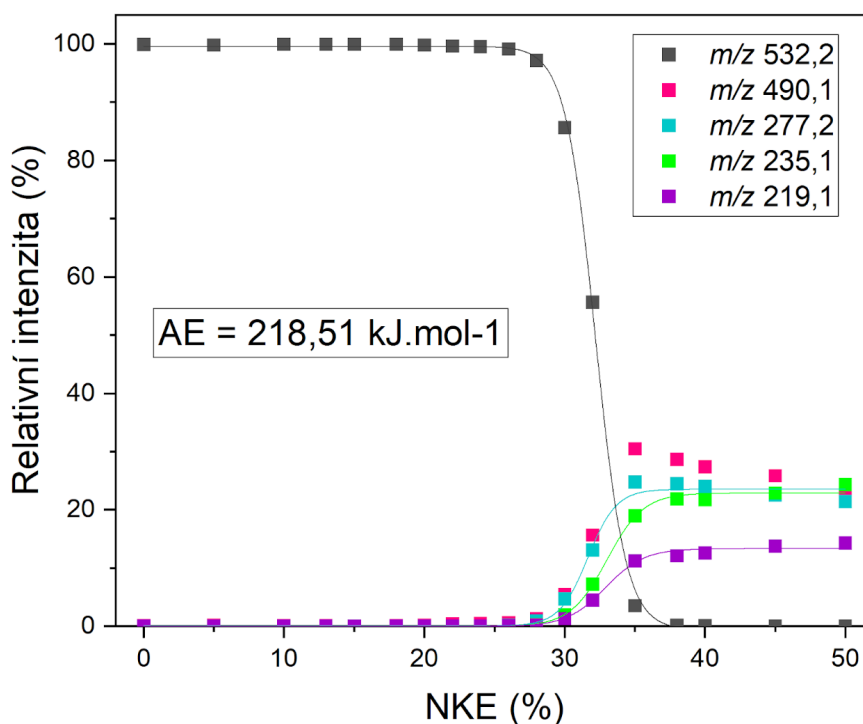
**Obrázek č. 14** Závislost poměru intenzit oxidované ku protonované formě terkonazolu na koncentraci  $\text{ZnCl}_2$  ve vzorku terkonazolu ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a  $\text{ZnCl}_2$  v  $\text{CH}_3\text{COH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1)

#### 4.4 Určení stability prekurzorů $[\text{Ter}+\text{H}]^+$ , $[\text{CuTer}]^+$ , $[\text{CuTerCl}]^+$

Na základě spektra  $\text{CuCl}_2$  a terkonazolu (Kap. 4.2) byly pro MS/MS experimenty vybrány ionty  $[\text{Ter}+\text{H}]^+$ ,  $[\text{CuTer}]^+$ , a  $[\text{CuTerCl}]^+$ . Jak bylo diskutováno v kapitole 4.2, signál iontu  $[\text{CuTer}]^+$   $m/z$  594 je ovšem zároveň druhý pík iontu  $[\text{Cu}(\text{Ter}-\text{H})]^+$ , a proto mohou být výsledky zkreslené a zatížené chybou.

Při CID experimentech fragmentovaly prekurzorové ionty hned na několik produktových iontů, jejichž struktura popsána v následující kapitole 4.5. Pro určení stability prekurzorů pomocí rovnice (1) uvedené na str. 23 byly vybrány pouze fragmenty s relativní intenzitou vyšší než 10 % při nejvyšší použité hodnotě NKE. Pro výpočet AE dále nebyly použity proložené sigmoidní funkce produktových iontů s hodnotou  $R < 0,99$ , a jejich křivky tedy ani nejsou zobrazeny na následujících grafech (Obr. 15, 17). Jednotlivé nezprůměrované hodnoty AE prekurzorových iontů vypočtené pomocí všech uvedených produktových iontů jsou uvedeny v Tabulce 3 na str. 34.

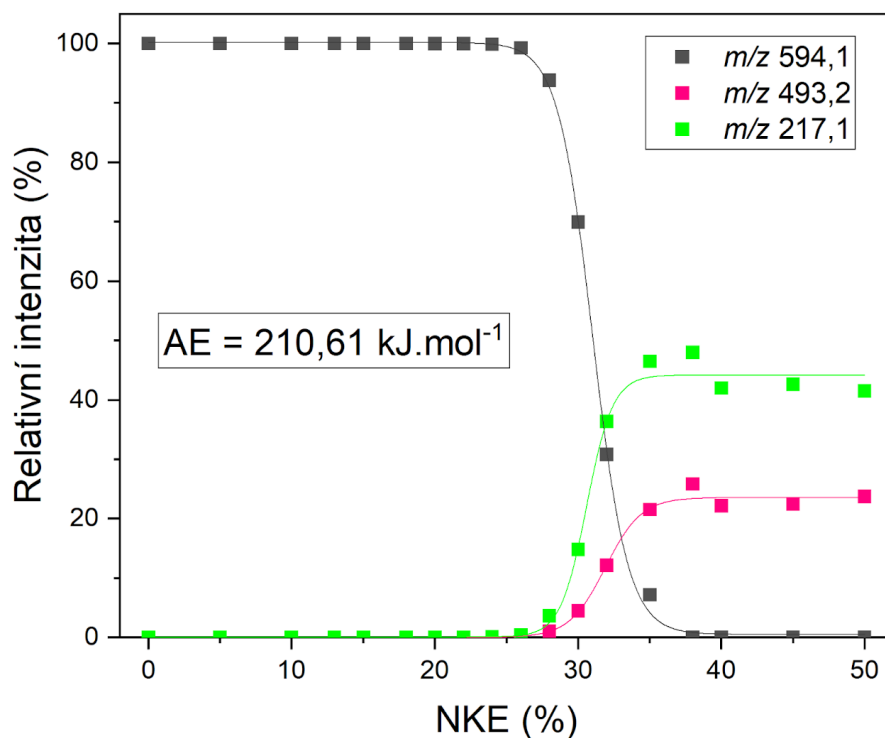
Ion  $[\text{Ter}+\text{H}]^+$  ( $m/z$  532,2) fragmentoval na čtyři produktové ionty s vyšší relativní intenzitou než 10 % při nejvyšší hodnotě NKE a to  $m/z$  490,1,  $m/z$  277,2,  $m/z$  235,1 a  $m/z$  219,1. Zprůměrováním hodnot AE vypočtených podle rovnice (1) pomocí uvedených produktových iontů byla pro tento prekurzorový ion vypočtena hodnota AE 218,51  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Obr. 15).



**Obrázek č.15** Graf závislosti relativní intenzity prekurzorového iontu  $[\text{TerH}]^+$   $m/z$  532 a příslušných produktových iontů na NKE při CID experimentu

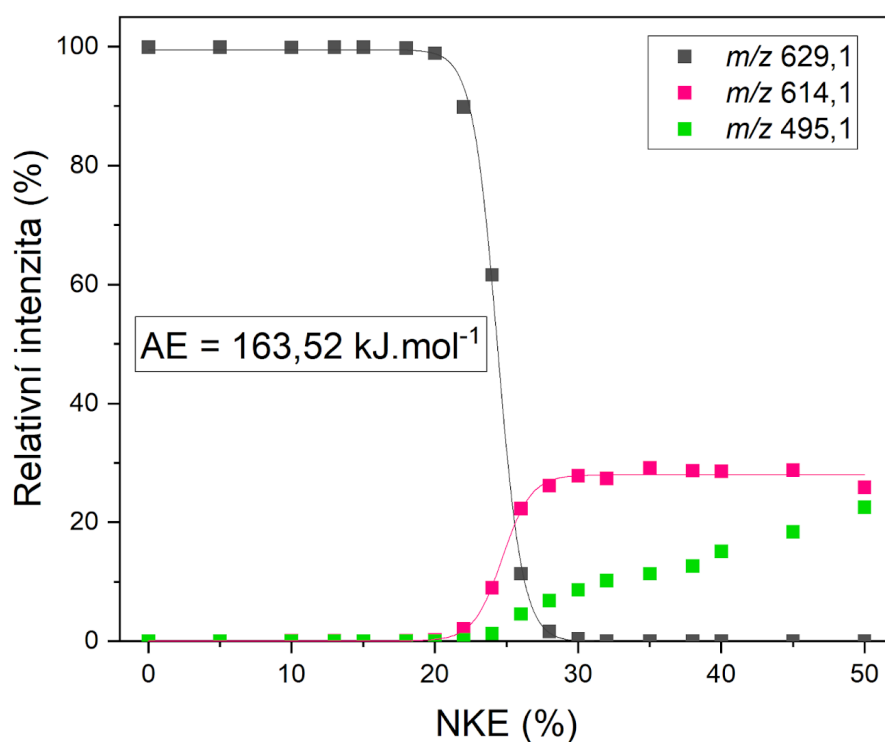


Prekurzorový iont  $[\text{CuTer}]^+$  ( $m/z$  594,1) fragmentoval na dva produktové ionty s vyšší relativní intenzitou než 10 % při nejvyšší hodnotě NKE a to  $m/z$  493,2 a  $m/z$  217,1. Zprůměrovaná hodnota AE pro prekurzorový iont  $[\text{CuTer}]^+$  byla  $210,61 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , tedy o 3,6 % nižší než stabilita iontu  $[\text{Ter}+\text{H}]^+$  (Obr. 16).



**Obrázek č.16** Graf závislosti relativní intenzity prekurzorového iontu  $[\text{CuTer}]^+$   $m/z$  594 a příslušných produktových iontů na NKE při CID experimentu

Prekurzorový iont  $[\text{CuTerCl}]^+$  ( $m/z$  629,1) fragmentoval na dva produktové ionty s vyšší relativní intenzitou než 10 % při nejvyšší hodnotě NKE a to  $m/z$  614,1 a  $m/z$  495,1. Stejným postupem jako v předešlých dvou případech byla pro tento prekurzorový iont určena hodnota AE  $163,52 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Stabilita tohoto komplexu je tedy o 25,2 % nižší než stabilita iontu  $[\text{Ter}+\text{H}]^+$  (Obr. 17 na str. 34).



**Obrázek č. 17** Graf závislosti relativní intenzity prekurzorového iontu  $[\text{CuTerCl}]^+$   $m/z$  629 a příslušných produktových iontů na NKE při CID experimentu

**Tabulka č. 3** Hodnoty AE ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) prekurzorových iontů  $[\text{Ter}+\text{H}]^+$   $m/z$  532,  $[\text{CuTer}]^+$   $m/z$  594,  $[\text{CuTerCl}]^+$   $m/z$  629 vypočtená na základě intenzit produktových iontů pomocí rovnice (1) ze str. 23

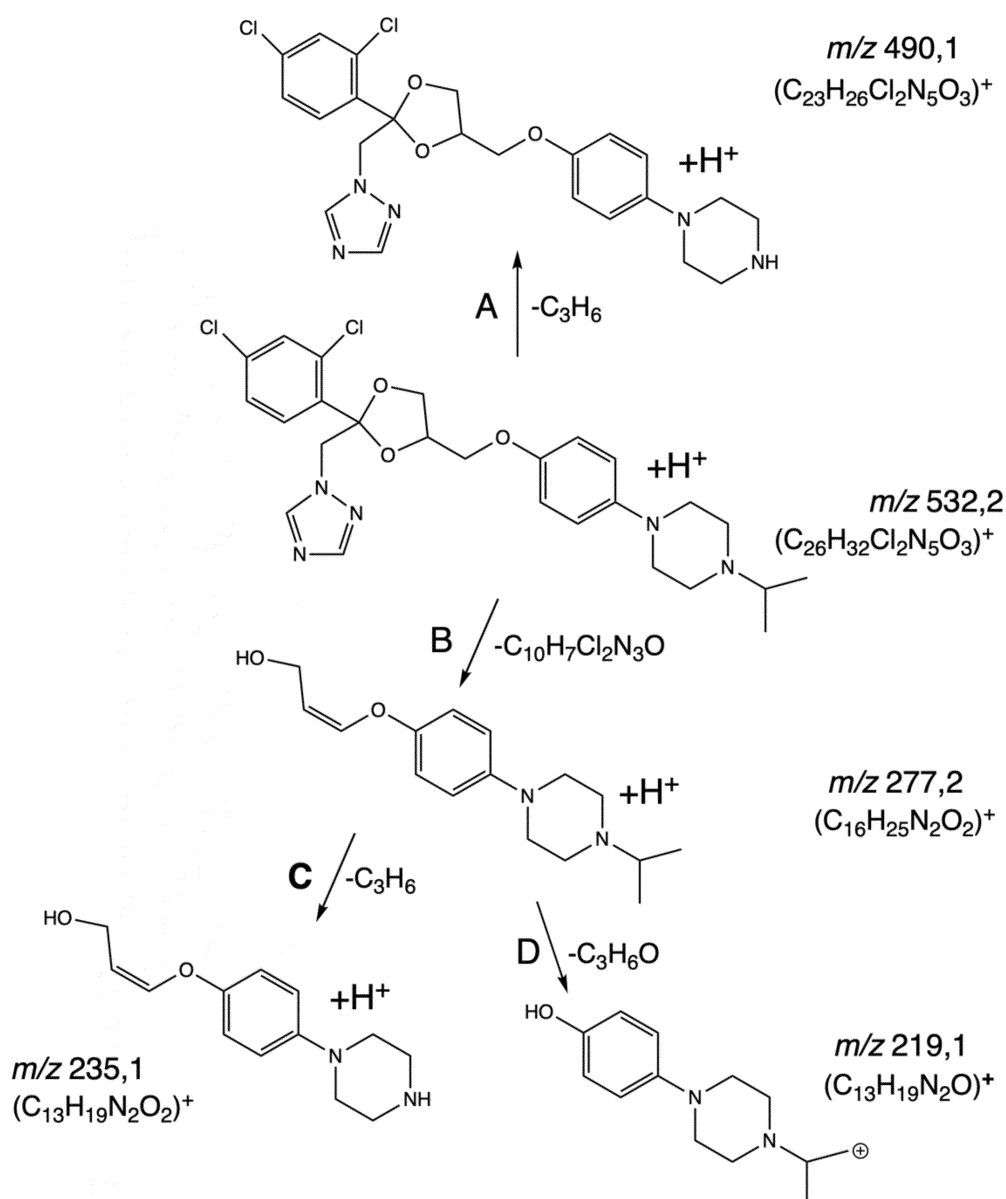
| $m/z$<br>produktové-<br>ho iontu | AE $[\text{Ter}+\text{H}]^+$<br>( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) | $m/z$<br>produktové-<br>ho iontu | AE $[\text{CuTer}]^+$<br>( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) | $m/z$<br>produktové-<br>ho iontu | AE<br>$[\text{CuTerCl}]^+$<br>( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) |
|----------------------------------|---|----------------------------------|--|----------------------------------|---|
| 490,1                            | -   | 493,2                            | 213,16   | 614,1                            | 163,52  |
| 277,2                            | 213,89  | 217,1                            | 208,05   | 495,1                            | -   |
| 235,2                            | 222,65  |                                  |  |                                  |   |
| 219,1                            | 219,00  |                                  |  |                                  |   |
| průměr                           | $218,51 \pm 4,40$   |                                  | $210,61 \pm 3,61$  |                                  | $163,52 \pm 0,00$   |

- Hodnoty vyloučeny na základě sigmoidní funkce  $R < 0,99$

## 4.5 Struktura fragmentů

### 4.5.1 Struktura fragmentu prekursoru [TerH]<sup>+</sup>

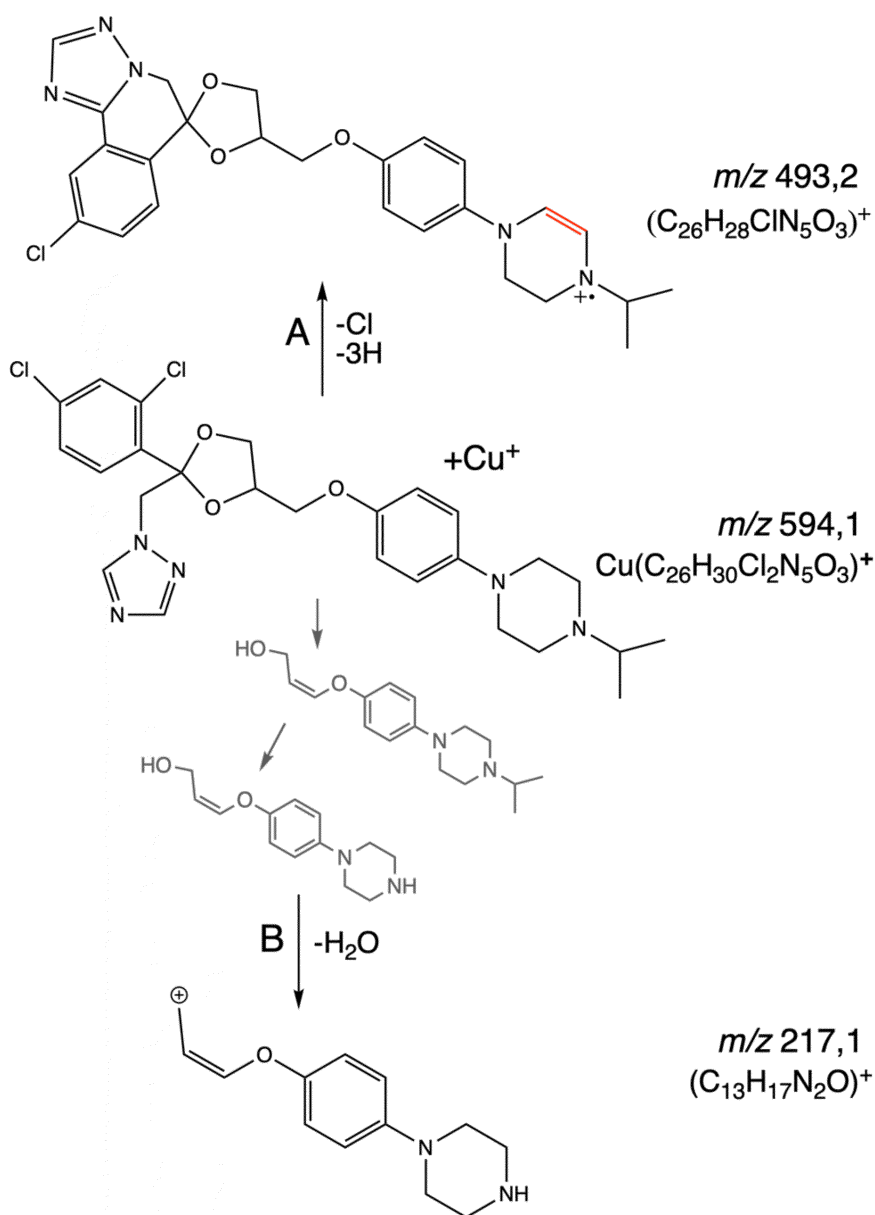
Fragment se signálem  $m/z$  490,1 odpovídá ztrátě izopropylu z piperazinového kruhu molekuly prekursoru (Obr. 18 A). Signál  $m/z$  277,2 patří fragmentu odštěpenému z prekursoru na dioxolanovém kruhu, u kterého došlo ke vzniku jedné dvojně vazby (Obr. 18 B). Fragment  $m/z$  235,1 odpovídá odštěpení izopropylu z fragmentu  $m/z$  277,2 (Obr. 18 C). Fragment se signálem  $m/z$  219,1 vznikl odštěpením prop-2-en-olu z fragmentu  $m/z$  277,2 (Obr. 18 D)<sup>53</sup>.



Obrázek č. 18 Schéma fragmentace molekulového iontu [Ter+H]<sup>+</sup> ( $m/z$  532)<sup>53</sup>

#### 4.5.2 Struktura fragmentů prekursoru [CuTer]<sup>+</sup>

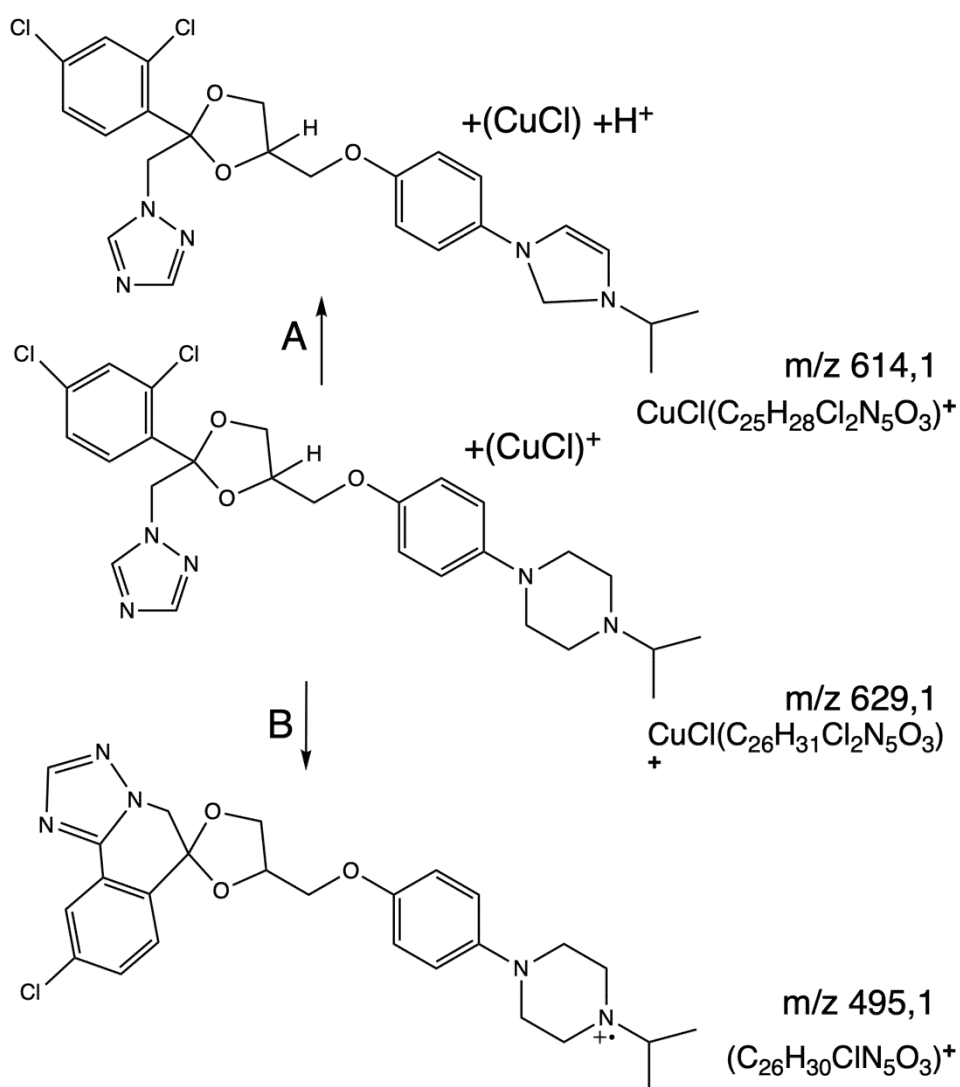
Signál  $m/z$  493,2 [Ter-3H-Cl]<sup>+</sup> je fragment terkonazolu s dvojnou vazbou a bez atomu chloru, u kterého vznikla vazba mezi aryl-radikálem a molekulou triazolu, a který je zároveň zoxidovaný na piperazinovém kruhu (Obr. 19 A)<sup>54,55</sup>. Umístění dvojně vazby ve schématu je pouze orientační, přesné umístění této dvojně vazby v molekule by šlo určit pomocí teorie funkcionálu hustoty. Fragment se signálem  $m/z$  217,1 vzniká fragmentu  $m/z$  234, popsaného v předešlé kapitole (Obr. 18 C na str. 35), odštěpením molekuly vody (Obr. 19 B)<sup>53</sup>.



**Obrázek č. 19** Schéma fragmentace prekursorového iontu [CuTer]<sup>+</sup> ( $m/z$  594)<sup>53,54,55</sup>. Červená barva dvojně vazby značí pouze orientační umístění této vazby. Přesné umístění této dvojně vazby v molekule by šlo určit pomocí teorie funkcionálu hustoty.

### 4.5.3 Struktura fragmentů [CuTerCl]<sup>+</sup>

Fragmentem  $m/z$  614,1 odpovídá vzniku dvojné vazby a ztrátě  $\text{CH}_2$  a z piperazinovém kruhu (Obr. 20 A). Dle publikovaných degradačních mechanismů vzniká tento fragment terkonazolu z N-oxidu terkonazolu. V prvním kroku vzniká z terkonazolu začleněním atomu kyslíku do piperazinového kruhu nestabilní produkt, ze kterého se následně odštěpí molekula  $\text{CH}_3\text{OH}$  a vzniká tak pětičlenný kruh<sup>53</sup>. Jako u předchozího prekurzorového iontu, ovšem bez dvojné vazby, zde vznikl fragment se signálem  $m/z$  495,1, který patří terkonazolu bez atomu chloru, u kterého vznikla vazba mezi aryl-radikálem a molekulou triazolu, a který je zoxidovaný na piperazinovém kruhu (Obr. 20 B)<sup>54,55</sup>.



Obrázek č. 20 Schéma fragmentace prekurzorového iontu [CuTerCl]<sup>+</sup> ( $m/z$  629)<sup>53,54,55</sup>

## 4.6 Vliv pH na tvorbu komplexů

Jak bylo zmíněno v teoretické části, pH vaginální oblasti se pohybuje v rozmezí 4 až 5 a lokální aplikace triazolových fungicidů může pH ještě mírně snížit<sup>65,66</sup>. pH terkonazolu ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ ) a  $\text{CuCl}_2$  ( $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ ) bylo 7,2, a bylo tedy nutné vyloučit případný vliv nižšího pH na tvorbu komplexů nebo vlastnosti terkonazolu. Pro tyto experimenty byla zvolena koncentrace  $\text{CuCl}_2$   $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ , která byla použita i pro fragmentační experimenty (Kap. 4.4 a 4.5) a zároveň byl při této koncentraci dostatečně vysoký poměr oxidovaného terkonazolu ku protonovanému terkonazolu, a to 14,7 % (Obr. 12 na str. 30).

pH bylo upraveno pomocí kyseliny mravenčí, protože v tomto případě nebylo vhodné použít pufr, jelikož přítomnost dalších iontů by komplikovala tvorbu a stanovení studovaných komplexů. Nejdříve byly připraveny čtyři roztoky terkonazolu ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ ) s kyselinou mravenčí o koncentraci  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $7 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$  a  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ , a poté celkem pět roztoků terkonazolu ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ ) a  $\text{CuCl}_2$  ( $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ ) s kyselinou mravenčí o koncentraci  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $7 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $3 \cdot 10^{-4}$  a  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ . Ve všech roztocích bylo změřeno pH (Tab. 4 a 5) a následně provedeno ESI-MS měření. Relativní intenzita uvedených iontů ve spektrech napříč škálou pH (Obr. 21 na str. 39 a 22 na str. 40) byla vypočtena jako podíl jejich intenzity z celkového součtu intenzit nejzastoupenějších iontů.

**Tabulka č. 4** pH roztoků terkonazolu ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ ) s variabilní koncentrací kyseliny mravenčí

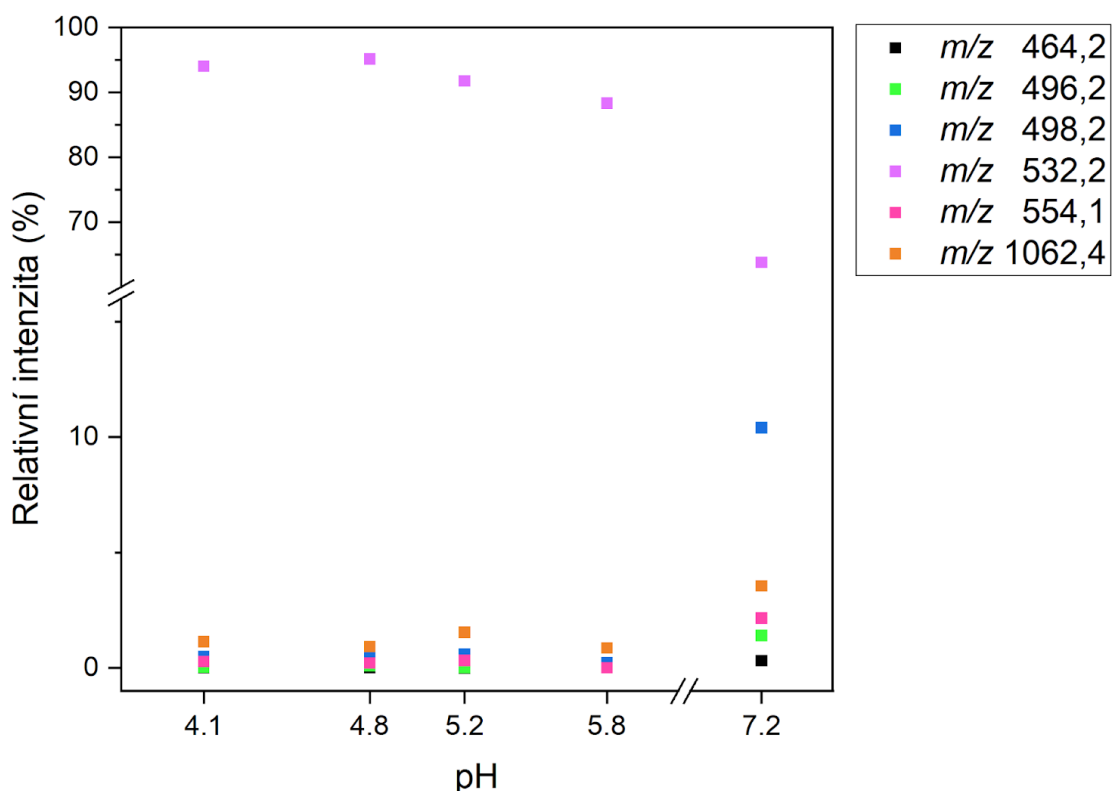
| Koncentrace HCOOH<br>( $10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ ) | 5   | 7   | 10  | 50  |
|--|-----|-----|-----|-----|
| Naměřené pH  | 5,8 | 5,2 | 4,8 | 4,1 |

**Tabulka č. 5** pH roztoků terkonazolu ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ ) a  $\text{CuCl}_2$  ( $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ ) s variabilní koncentrací kyseliny mravenčí

| Koncentrace HCOOH<br>( $10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ ) | 5   | 7   | 10  | 30  | 50  |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|
| Naměřené pH  | 5,4 | 5,0 | 4,9 | 4,2 | 4,0 |

Z grafu na Obrázku 21 je vidět, že ve spektru terkonazolu ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) měl při pH 4,1 až 5,8 majoritní zastoupení iont  $[\text{Ter}+\text{H}]^+$  ( $m/z$  532,2), průměrně 91,9 %. Při pH 7,2 jeho zastoupení kvůli nižší koncentraci  $\text{H}^+$  iontů kleslo na 57,1 %, a naopak vzrostlo zastoupení dechlorovaných iontů  $[(\text{Ter}-2\text{Cl}+2\text{H})+\text{H}]^+$  ( $m/z$  464,3),  $[(\text{Ter}-\text{Cl}-\text{H})+\text{H}]^+$  ( $m/z$  496,2),  $[(\text{Ter}-\text{Cl}-\text{H})+\text{H}]^+$  ( $m/z$  498,2), aduktu  $[\text{Ter}+\text{Na}]^+$  ( $m/z$  554,1) a  $[(\text{Ter})(\text{Ter}^{\text{O}+})]^+$  ( $m/z$  1062,4).

Čtyři degradační produkty vznikající v kyselém prostředí<sup>53</sup>, popsané v teoretické části (Obr. 4 na str. 15), v tomto rozmezí pH nevznikly.



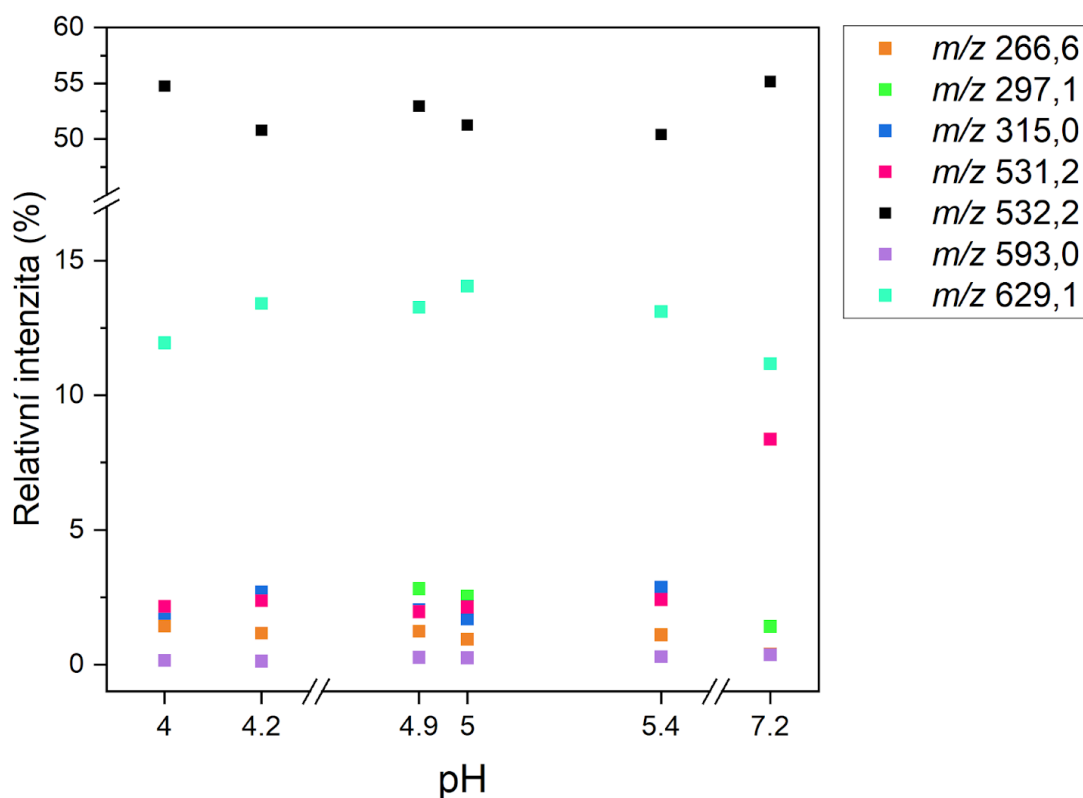
**Obrázek č. 21** Závislost relativních intenzit ESI-MS signálů na pH terkonazolu ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) v  $\text{CH}_3\text{COH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1).  $[(\text{Ter}-2\text{Cl}+2\text{H})+\text{H}]^+$  ( $m/z$  464,3),  $[(\text{Ter}-\text{Cl}-\text{H})+\text{H}]^+$  ( $m/z$  496,2),  $[(\text{Ter}-\text{Cl}+\text{H})+\text{H}]^+$  ( $m/z$  498,2),  $[\text{Ter}+\text{H}]^+$  ( $m/z$  532,2),  $[\text{Ter}+\text{Na}]^+$  ( $m/z$  554,1),  $[(\text{Ter})(\text{Ter}^{\text{O}+})]^+$  ( $m/z$  1062,4).

Ve spektrech  $\text{CuCl}_2$  a terkonazolu (10:1) bylo zastoupení jednotlivých iontů poměrně stabilní při všech studovaných pH (Obr. 22 na str. 40). Jedinou výjimkou byl oxidovaný terkonazol  $[\text{Ter}]^{\text{O}+}$  ( $m/z$  531,2), který měl při pH 7,2 relativní intenzitu 8,36 % (jde o jeho zastoupení ve spektru, ne poměr ku protonovanému terkonazolu), a naopak při pH 4 až 5,4 se jeho relativní intenzita pohybovala průměrně okolo 2,21 %. Protonace terkonazolu způsobená přítomností  $\text{H}^+$  iontů tedy byla významnější než jeho oxidace způsobená ionty  $\text{Cu}^{2+}$ , i pokud

byla koncentrace  $\text{CuCl}_2$  desetkrát vyšší než koncentrace  $\text{HCOOH}$  (vzorek s pH 5,4 obsahoval  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$   $\text{HCOOH}$  a  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$   $\text{CuCl}_2$ ). U diskutovaných tělísek se dá navíc předpokládat, že uvolňují nižší koncentraci iontu  $\text{Cu}^{2+}$ , než jaká byla použita pro experiment<sup>78,79</sup>.

Ani v tomto případě nebyly v použitém rozmezí pH detekovány dříve publikované degradační produkty vznikající v kyselém prostředí<sup>53</sup>.

Signál  $m/z$  266,6 patří komplexu  $[\text{Ter}+2\text{H}]^{2+}$  a signál  $m/z$  315,0 komplexu  $[\text{CuTerCl}+\text{H}]^{2+}$ . Na rozdíl od komplexu  $[\text{CuTerCl}+\text{H}]^{2+}$  ( $m/z$  315,0) u komplexu  $[\text{CuTer}]^{2+}$  ( $m/z$  297,1) nelze určit, zda se v něm vyskytuje měď v oxidačním stavu  $\text{Cu}^{2+}$ , nebo  $\text{Cu}^+$  spolu s oxidovaným terkonazolem. Vzhledem k tomu, že relativní intenzita tohoto iontu nestoupá ani při pH 7,2, jako je tomu u  $[\text{Ter}]^{\text{o}+}$ , lze předpokládat, že náboj nese pouze atom mědi. Další sledované ionty byly  $[\text{Ter}+\text{H}]^+$  ( $m/z$  532,2),  $[\text{CuTer}]^+$  ( $m/z$  594),  $[\text{CuTerCl}]^+$  ( $m/z$  629,1).



**Obrázek č. 22** Závislost relativních intenzit ESI-MS signálů na pH v terkonazolu ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a  $\text{CuCl}_2$  ( $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) v  $\text{CH}_3\text{COH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1).  $[\text{Ter}+2\text{H}]^{2+}$  ( $m/z$  266,6),  $[\text{CuTer}]^{2+}$  ( $m/z$  297,1),  $[\text{CuTerCl}+\text{H}]^{2+}$  ( $m/z$  315,0),  $[\text{Ter}]^{\text{o}+}$  ( $m/z$  531,2),  $[\text{Ter}+\text{H}]^+$  ( $m/z$  532,2),  $[\text{CuTer}]^+$  ( $m/z$  594),  $[\text{CuTerCl}]^+$  ( $m/z$  629,1).



## 5 Závěr

Terkonazol tvořil s ionty mědi komplexy  $[\text{CuTer}]^+$ ,  $[\text{CuTerCl}]^+$ , které byly dále studovány pomocí ESI-MS/MS. Na rozdíl od jiných triazolových fungicidů netvořil terkonazol s ionty mědi oligomery s významným zastoupením ve spektru, a to zřejmě kvůli své vyšší molekulové hmotnosti ovlivňující stabilitu takových komplexů. Stabilita, stanovená jako hodnota AE, nejzastoupenějšího komplexu s mědí  $[\text{CuTerCl}]^+$  byla o 25,2 % nižší než stabilita nejzastoupenějšího iontu  $[\text{Ter}+\text{H}]^+$ . Komplex  $[\text{CuTer}]^+$ , který obsahuje měď v oxidačním stavu  $\text{Cu}^+$ , měl stabilitu nižší o 3,6 %. Fragменты vznikající při CID experimentech se shodovaly s některými dříve publikovanými fragmenty terkonazolu z degračních studií<sup>53,54</sup>.

Zároveň bylo zjištěno, že rostoucí koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  zvýšila při neutrálním pH intenzitu iontu  $[\text{CuTerCl}]$  a oxidaci terkonazolu. Terkonazol je oxidován odevzdáním jednoho elektronu z piperazinového kruhu a dochází tak ke vzniku radikál-kationtu<sup>55</sup>. Tato oxidace byla způsobena majoritně ionty  $\text{Cu}^{2+}$  a případnými produkty Fentonovy reakce, nikoli iontovou silou roztoku, protože experiment se zinečnatými ionty oxidaci terkonazolu nezvyšoval.

Dále se ukázalo, že ve spektrech terkonazolu s pH v rozmezí 4,1 až 5,8, simulující pH vaginální oblasti, měl protonovaný terkonazol vyšší zastoupení než při pH 7,2. Ve spektrech terkonazolu a  $\text{CuCl}_2$  (1:10) bylo zastoupení sledovaných iontů v rozmezí pH 4 až 7,2 poměrně konzistentní s výjimkou oxidovaného terkonazolu  $[\text{Ter}]^{\circ+}$ , jehož zastoupení při pH 7,2 až 3,8× vzrostlo. pH v oblasti 4 až 5,4 tedy nemělo vliv na míru zastoupení komplexů terkonazolu s ionty mědi, pouze na míru oxidace samotného terkonazolu.

Degrační produkty vznikající v kyselém prostředí, popsané v teoretické části<sup>53</sup>, nebyly v žádném ze vzorků detekovány. Ani upravené pH, simulující pH vaginální oblasti, nezpůsobilo vznik těchto fragmentů. Naopak dechlorované fragmenty, vznikající dle publikovaných degračních studií v roztoku terkonazolu účinkem UV záření<sup>54</sup>, byly detekovány v MS i MS/MS spektrech.

Popsané komplexy iontů mědi s terkonazolem by bylo vhodné podrobit toxikologickým studiím, protože tyto komplexy by mohly vykazovat odlišné chování od samotného terkonazolu.

## 6 Použitá literatura

- (1) PubChem (nedatováno). *1,2,4-Triazole* [online]. [cit. 20.11.2021]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9257>
- (2) Ústřední kontrolní a zkušební ústav (nedatováno). *Statistické údaje o uvádění na trh. Množství účinných látek obsažených v přípravcích na ochranu rostlin v roce 2019* [online]. [cit. 26.11.2021]. Dostupné z: [https://eagri.cz/public/web/file/674354/Statistika\\_uvadeni\\_UL\\_obsazenych\\_v\\_pripravcich\\_na\\_ochranu\\_rostlin\\_na\\_trh\\_2019.pdf](https://eagri.cz/public/web/file/674354/Statistika_uvadeni_UL_obsazenych_v_pripravcich_na_ochranu_rostlin_na_trh_2019.pdf)
- (3) Al-Mohsen, I.; Hughes, W. T.: Systemic Antifungal Therapy: Past, Present and Future. *Annals of Saudi Medicine* **18**:1, 28–38 (1998).
- (4) Van Cutsem, J.: The in Vitro Activity of Terconazole against Yeasts: Its Topical Long-Acting Therapeutic Efficacy in Experimental Vaginal Candidiasis in Rats. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **165**:4 (Part 2), 1200–1206 (1991)
- (5) Kullberg, B. J.; Arendrup, M. C.: Invasive Candidiasis. *New England Journal of Medicine* **373**:15, 1445–1456 (2015).
- (6) Konášová, R.; Jaklová Dytrtová, J.; Kašička, V.: Determination of Acid Dissociation Constants of Triazole Fungicides by Pressure Assisted Capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1408**, 243–249 (2015).
- (7) Brancato, A.; Brocca, D.; Cabrera, L. C.; Chiusolo, A.; Civitella, C.; Marques, D. C.; Crivellente, F.; Lentdecker, C. D.; Erdős, Z.; Ferreira, L.; Goumenou, M.; Greco, L.; Istace, F.; Jarrah, S.; Kardassi, D.; Leuschner, R.; Medina, P.; Mineo, D.; Miron, I.; Molnar, T.; Nave, S.; Morte, J. M. P.; Pedersen, R.; Reich, H.; Sacchi, A.; Santos, M.; Stanek, A.; Sturma, J.; Tarazona, J.; Terron, A.; Theobald, A.; Vagenende, B.; Villamar-Bouza, L.: Peer Review of the Pesticide Risk Assessment for the Triazole Derivative Metabolites in Light of Confirmatory Data Submitted. *EFSA Journal* **16**:7, Art. No. e05376 (2018).
- (8) Halešová, T.; Václavíková, M.; Tomešová, D.; Erban, T.: 1,2,4-triazol: (Ne)známý relevantní metabolit ve vodách? *Vodní hospodářství* (2021).
- (9) Assress, H. A.; Nyoni, H.; Mamba, B. B.; Msagati, T. A. M.: Occurrence and Risk Assessment of Azole Antifungal Drugs in Water and Wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **187**, Art. No. 109868 (2020).

- (10) Kahle, M.; Buerge, I. J.; Hauser, A.; Müller, M. D.; Poiger, T.: Azole Fungicides: Occurrence and Fate in Wastewater and Surface Waters. *Environmental Science & Technology* **42**:19, 7193–7200 (2008).
- (11) Joon-Woo, K.; Hyo-Sang, J.; Jong-Gu, K.; Ishibashi, H.; Hirano, M.; Nasu, K.; Ichikawa, N.; Takao, Y.; Shinohara, R.; Arizono, K.: Occurrence of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) in Surface Water from Mankyung River, South Korea. *Journal of Health Science* **55**:2, 249–258 (2009).
- (12) Fang, S.; Yu, W.; Li, C.; Liu, Y.; Qiu, J.; Kong, F.: Adsorption Behavior of Three Triazole Fungicides on Polystyrene Microplastics. *Science of The Total Environment* **691**, 1119–1126 (2019).
- (13) Lindberg, R. H.; Östman, M.; Olofsson, U.; Grabic, R.; Fick, J.: Occurrence and Behaviour of 105 Active Pharmaceutical Ingredients in Sewage Waters of a Municipal Sewer Collection System. *Water Research* **58**, 221–229 (2014).
- (14) PubChem (nedatováno). *Terconazole* [online]. [cit. 21.11.2021]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441383>
- (15) Wang, F.; Yao, S.; Cao, D.; Ju, C.; Yu, S.; Xu, S.; Fang, H.; Yu, Y.: Increased Triazole-Resistance and Cyp51A Mutations in *Aspergillus Fumigatus* after Selection with a Combination of the Triazole Fungicides Difenoconazole and Propiconazole. *Journal of Hazardous Materials* **400**, Art. No. 123200 (2020).
- (16) Yoshida, Y.; Aoyama, Y.: Interaction of Azole Antifungal Agents with Cytochrome P-45014DM Purified from *Saccharomyces Cerevisiae* Microsomes. *Biochemical Pharmacology* **36**:2, 229–235 (1987).
- (17) Lipesheva, G. I.; Hargrove, T. Y.; Kleshchenko, Y.; Nes, W. D.; Villalta, F.; Waterman, M. R.: CYP51: A Major Drug Target in the Cytochrome P450 Superfamily. *Lipids* **43**:12, 1117–1125 (2008).
- (18) Lipesheva, G. I.; Waterman, M. R.: Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase Cytochrome P450 (CYP51), a P450 in All Biological Kingdoms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1770**:3, 467–477 (2007).
- (19) Bui, T. T.; Suga, K.; Umakoshi, H.: Roles of Sterol Derivatives in Regulating the Properties of Phospholipid Bilayer Systems. *Langmuir* **32**:24, 6176–6184 (2016).

- (20) Hargrove, T. Y.; Friggeri, L.; Wawrzak, Z.; Qi, A.; Hoekstra, W. J.; Schotzinger, R. J.; York, J. D.; Guengerich, F. P.; Lepesheva, G. I.: Structural Analyses of Candida Albicans Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase Complexed with Azole Drugs Address the Molecular Basis of Azole-Mediated Inhibition of Fungal Sterol Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **292**:16, 6728–6743 (2017).
- (21) Odds, F. C.; Brown, A. J. P.; Gow, N. A. R.: Antifungal Agents: Mechanisms of Action. *Trends in Microbiology* **11**:6, 272–279 (2003).
- (22) Saag, M. S.; Dismukes, W. E.: Azole Antifungal Agents: Emphasis on New Triazoles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32**:1, 1–8 (1988).
- (23) Munkboel, C. H.; Rasmussen, T. B.; Elgaard, C.; Olesen, M.-L. K.; Kretschmann, A. C.; Styrihave, B.: The Classic Azole Antifungal Drugs Are Highly Potent Endocrine Disruptors in Vitro Inhibiting Steroidogenic CYP Enzymes at Concentrations Lower than Therapeutic Cmax. *Toxicology* **425**, Art. No. 152247 (2019).
- (24) Cole, P. A.; Robinson, C. H.: Mechanism and Inhibition of Cytochrome P-450 Aromatase. *Journal of Medicinal Chemistry* **33**:11, 2933–2942 (1990).
- (25) Egbuta, C.; Lo, J.; Ghosh, D.: Mechanism of Inhibition of Estrogen Biosynthesis by Azole Fungicides. *Endocrinology* **155**:12, 4622–4628 (2014).
- (26) Pater, J. L.: Randomized Trial of Letrozole Following Tamoxifen as Extended Adjuvant Therapy in Receptor-Positive Breast Cancer: Updated Findings from NCIC CTG MA.17. *Journal of the National Cancer Institute* **97**:17, 1267–1271 (2005).
- (27) Lv, X.; Pan, L.; Wang, J.; Lu, L.; Yan, W.; Zhu, Y.; Xu, Y.; Guo, M.; Zhuang, S.: Effects of Triazole Fungicides on Androgenic Disruption and CYP3A4 Enzyme Activity. *Environmental Pollution* **222**, 504–512 (2017).
- (28) Currie, R. A.; Pepper, R. C.; Goetz, A. K.; Omiecinski, C. J.; Goodman, J. I.: Phenobarbital and Propiconazole Toxicogenomic Profiles in Mice Show Major Similarities Consistent with the Key Role That Constitutive Androstane Receptor (CAR) Activation Plays in Their Mode of Action. *Toxicology* **321**, 80–88 (2014).
- (29) Fernández-Vizcaíno, E.; Fernández de Mera, I. G.; Mougeot, F.; Mateo, R.; Ortiz-Santaliestra, M. E.: Multi-Level Analysis of Exposure to Triazole Fungicides through Treated Seed Ingestion in the Red-Legged Partridge. *Environmental Research* **189**, Art. No. 109928 (2020).
- (30) Jakl, M.; Zeljković, S. Č.; Kovač, I.; Bělonožníková, K.; Jaklová Dyrtrtová, J.: Side Effects of Triazoles on Treated Crops. *Chemosphere* **277**, Art. No. 130242 (2021).

- (31) Levent Tuna, A.: Influence of Foliarly Applied Different Triazole Compounds on Growth, Nutrition, and Antioxidant Enzyme Activities in Tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) under Salt Stress. *Australian Journal of Crop Science* **8**:1, 71–79 (2014).
- (32) Shen, W.; Yang, G.; Guo, Q.; Lv, L.; Liu, L.; Wang, X.; Lou, B.; Wang, Q.; Wang, Y.: Combined Toxicity Assessment of Myclobutanil and Thiamethoxam to Zebrafish Embryos Employing Multi-Endpoints. *Environmental Pollution* **269**, Art. No. 116116 (2021).
- (33) Teng, M.; Chen, X.; Wang, C.; Song, M.; Zhang, J.; Bi, S.; Wang, C.: Life Cycle Exposure to Propiconazole Reduces Fecundity by Disrupting the Steroidogenic Pathway and Altering DNA Methylation in Zebrafish (*Danio Rerio*). *Environment International* **135**, Art. No. 105384 (2020).
- (34) Sun, Y.; Cao, Y.; Tong, L.; Tao, F.; Wang, X.; Wu, H.; Wang, M.: Exposure to Prothioconazole Induces Developmental Toxicity and Cardiovascular Effects on Zebrafish Embryo. *Chemosphere* **251**, Art. No. 126418 (2020).
- (35) Altenhofen, S.; Nabinger, D. D.; Wiprich, M. T.; Pereira, T. C. B.; Bogo, M. R.; Bonan, C. D.: Tebuconazole Alters Morphological, Behavioral and Neurochemical Parameters in Larvae and Adult Zebrafish (*Danio Rerio*). *Chemosphere* **180**, 483–490 (2017).
- (36) Evans, P. D.; Schmalzl, K. J.; Forsyth, C. M.; Fallon, G. D.; Schmid, S.; Bendixen, B.; Heimdal, S.: Formation and Structure of Metal Complexes with the Fungicides Tebuconazole and Propiconazole. *Journal of Wood Chemistry and Technology* **27**:(3–4), 243–256 (2007).
- (37) Jaklová Dyrtrtová, J.; Fanfrlík, J.; Norková, R.; Jakl, M.; Hobza, P. Theoretical Insight into the Stabilization of Triazole Fungicides via Their Interactions with Dications. *International Journal of Mass Spectrometry* **359**, 38–43 (2014).
- (38) Jakl, M.; Fanfrlík, J.; Jaklová Dyrtrtová, J.: Mimicking of Cyproconazole Behavior in the Presence of Cu and Zn. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **31**:23, 2043–2050 (2017).
- (39) Todd, J. F. J.: Recommendations for nomenclature and symbolism for mass spectroscopy (including an appendix of terms used in vacuum technology). (Recommendations 1991). *Pure and Applied Chemistry* **63**:10, 1541–1566 (1991).
- (40) Jaklová Dyrtrtová, J.; Bělonožníková, K.; Jakl, M.; Ryšlavá, H.: Triazoles and Aromatase: The Impact of Copper Cocktails. *Environmental Pollution* **266**, Art. No. 115201 (2020).

- (41) Arias, M.; Paradelo, M.; López, E.; Simal-Gándara, J.: Influence of pH and Soil Copper on Adsorption of Metalaxyl and Penconazole by the Surface Layer of Vineyard Soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:21, 8155–8162 (2006).
- (42) Kovač, I.; Jakl, M.; Fanfrlík, J.; Andrushchenko, V.; Jaklová Dyrťová, J.: Complexation and Stability of the Fungicide Penconazole in the Presence of Zinc and Copper Ions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **34**:9, Art. No. e8714 (2020).
- (43) Komárek, M.; Čadková, E.; Chrastný, V.; Bordas, F.; Bollinger, J. C.: Contamination of Vineyard Soils with Fungicides: A Review of Environmental and Toxicological Aspects. *Environment International* **36**:1, 138–151 (2010).
- (44) Sobel, J. D.: Vulvovaginal Candidosis. *The Lancet* **369**:9577, 1961–1971 (2007).
- (45) Cooper, C. R.; McGinnis, M. R.: In Vitro Susceptibility of Clinical Yeast Isolates to Fluconazole and Terconazole. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **175**:6, 1626–1631 (1996).
- (46) Reigada, C.; Sayé, M.; Valera-Vera, E.; Miranda, M. R.; Pereira, C. A.: Repurposing of Terconazole as an Anti Trypanosoma Cruzi Agent. *Heliyon* **5**:6, Art. No. e01947 (2019).
- (47) Yousry, C.; Zikry, P. M.; Basalious, E. B.; El-Gazayerly, O. N.: Self-Nanoemulsifying System Optimization for Higher Terconazole Solubilization and Non-Irritant Ocular Administration. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* **10**:3, 389–398 (2020).
- (48) Abdelbary, A. A.; Abd-Elsalam, W. H.; Al-Mahallawi, A. M.: Fabrication of Novel Ultradeformable Bilosomes for Enhanced Ocular Delivery of Terconazole: In Vitro Characterization, Ex Vivo Permeation and in Vivo Safety Assessment. *International Journal of Pharmaceutics* **513**:(1–2), 688–696 (2016).
- (49) Rizk, M.; Toubar, S. S.; El-Alamin, M. M. A.; Azab, M. M. M.: Micellar Liquid Chromatographic Determination of Sertaconazole and Terconazole in Bulk, Pharmaceutical Dosage Forms and Spiked Human Plasma. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, **52**:1, 155–164 (2014).
- (50) Yu, Y.; Zhang, J.; Shao, B.; Wu, Y.; Duan, H.; Liu, H.: Development of a Simple Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Multiresidue Determination of Antifungal Drugs in Chicken Tissues. *Journal of AOAC International* **94**:5, 1650–1658 (2011).
- (51) Castro-Puyana, M.; Crego, A. L.; Marina, M. L.; García-Ruiz, C.: Enantioselective Separation of Azole Compounds by EKC. Reversal of Migration Order of Enantiomers with CD Concentration. *ELECTROPHORESIS* **28**:15, 2667–2674 (2007).

- (52) Castro-Puyana, M.; Crego, A. L.; Marina, M. L.: Enantiomeric Separation of Ketoconazole and Terconazole Antifungals by Electrokinetic Chromatography: Rapid Quantitative Analysis of Ketoconazole in Pharmaceutical Formulations. *ELECTROPHORESIS* **26**:20, 3960–3968 (2005).
- (53) Chavan, B. B.; Prasanna, G. L.; Radhakrishnanand, P.; Kosuri, E. R.; Kalariya, P. D.; Talluri, M. V. N. K. Development of a Stability-Indicating UPLC Method for Terconazole and Characterization of the Acidic and Oxidative Degradation Products by UPLC-Q-TOF/MS/MS and NMR. *New Journal of Chemistry* **42**:13, 10761–10773 (2018).
- (54) da Silva, J. W. V.; Ribeiro, J. I.; de Souza, L. X.; da Silva Aquino, K. A.; Kishishita, J.; Sobrinho, J. L. S.; Leal, L. B.; de Castro, W. V.; Santana, D. P. de; Bedor, D. C. G.: Development of the Stability-Indicating Method, Structural Elucidation of New Photodegradation Products from Terconazole by LC-MS TOF, and in Vitro Toxicity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **216**, Art. No. 114794 (2022).
- (55) Fischer, J.; González-Martín, J.; Lochyński, P.; Dejmková, H.; Schwarzová-Pecková, K.; Vega, M.: Voltammetric Study of Triazole Antifungal Agent Terconazole on Sp<sup>3</sup> and Sp<sup>2</sup> Carbon-Based Electrode Materials. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **863**, Art. No. 114054 (2020).
- (56) Ferrer, J.: Vaginal Candidosis: Epidemiological and Etiological Factors. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* **71**, 21–27 (2000).
- (57) Amouri, I.; Sellami, H.; Borji, N.; Abbes, S.; Sellami, A.; Cheikhrouhou, F.; Maazoun, L.; Khaled, S.; Khrouf, S.; Boujelben, Y.; Ayadi, A.: Epidemiological Survey of Vulvovaginal Candidosis in Sfax, Tunisia. *Mycoses* **54**:5, 499–505 (2011).
- (58) Parewijk, W.; Claeys, G.; Thiery, M.; van Kets, H.: Candidiasis in Women Fitted with an Intrauterine Contraceptive Device. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* **95**:4, 408–410 (1988).
- (59) Auler, M. E.; Morreira, D.; Rodrigues, F. F. O.; Abr ão, M. S.; Margarido, P. F. R.; Matsumoto, F. E.; Silva, E. G.; Silva, B. C. M.; Schneider, R. P.; Paula, C. R.: Biofilm Formation on Intrauterine Devices in Patients with Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. *Medical Mycology* **48**:1, 211–216 (2010).
- (60) U.S. Food and Drug Administration (nedatováno). *FDA-Approved Drugs Database* [online]. [cit.13.3.2022]. Dostupné z: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&AppNo=019641>,

- <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=019579>,
- <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=021735>
- (61) Anjalika; Gupta, I.; Gupta, S. K.; Ganguly, N. K.: Reactive Oxygen Intermediates and Reactive Nitrogen Intermediates in Copper Intrauterine Device Users. *Contraception* **59**:1, 67–70 (1999).
- (62) Pacholak, A.; Burlaga, N.; Frankowski, R.; Zgoła-Grześkowiak, A.; Kaczorek, E.: Azole Fungicides: (Bio)Degradation, Transformation Products and Toxicity Elucidation. *Science of The Total Environment* **802**, Art. No. 149917 (2022).
- (63) Ducháčková, L.; Roithová, J.; Milko, P.; Žabka, J.; Tsierkezos, N.; Schröder, D. Comparative Study of Mono- and Dinuclear Complexes of Late 3d-Metal Chlorides with N,N-Dimethylformamide in the Gas Phase. *Inorganic Chemistry* **50**:3, 771–782 (2011).
- (64) Lykke, M. R.; Becher, N.; Haahr, T.; Boedtkjer, E.; Jensen, J. S.; Uldbjerg, N.: Vaginal, Cervical and Uterine pH in Women with Normal and Abnormal Vaginal Microbiota. *Pathogens* **10**:2, 90 (2021).
- (65) Miller, E.; Beasley, D.; Dunn, R.; Archie, E.: Lactobacilli Dominance and Vaginal pH: Why Is the Human Vaginal Microbiome Unique? *Frontiers in Microbiology* **7**:1936, (2016).
- (66) Donders, G. G.; Grinceviciene, S.; Ruban, K.; Bellen, G.: Vaginal pH and Microbiota during Fluconazole Maintenance Treatment for Recurrent Vulvovaginal Candidosis (RVVC). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **97**:2, Art. No. 115024 (2020).
- (67) Nováková, K.; Navrátil, T.; Jaklová Dyrtrtová, J.; Chýlková, J. Application of Copper Solid Amalgam Electrode for Determination of Fungicide Tebuconazole. *International Journal of Electrochemical Science* **8**, 1–16 (2013).
- (68) Population Reference Bureau (2019). *Family Planning Data 2019* [online]. [cit. 2.3.2022]. Dostupné z: [https://archive.prb.org/fpdata/#section\\_2](https://archive.prb.org/fpdata/#section_2)
- (69) Ali, M. M.; Sadler, R. K.; Cleland, J.; D. Ngo, T.; Shah, I. H (2011). *Long-Term Contraceptive Protection, Discontinuation and Switching Behaviour: Intrauterine Device (IUD) Use Dynamics in 14 Developing Countries* [online]. [cit. 2.3.2022]. Dostupné z: <https://www.msichoice.org/media/2122/long-term-contraceptive-protection-discontinuation-and-switching-behaviour.pdf>



- (70) Zhang, S.; Li, Y.; Yu, P.; Chen, T.; Zhou, W.; Zhang, W.; Liu, J.: In Vitro Release of Cupric Ion from Intrauterine Devices: Influence of Frame, Shape, Copper Surface Area and Indomethacin. *Biomedical Microdevices* **17**:1, Art. No. 19 (2015).
- (71) Trussell, J.; Lalla, A. M.; Doan, Q. V.; Reyes, E.; Pinto, L.; Gricar, J.: Cost Effectiveness of Contraceptives in the United States. *Contraception* **79**:1, 5–14 (2009).
- (72) Esposito, C. P.; LoGiudice, J.: Beliefs and Use of Intrauterine Devices (IUDs) Among Women’s Health Care Providers. *The Journal for Nurse Practitioners* **15**:9, 682–687 (2019).
- (73) Anderson, N.; Steinauer, J.; Valente, T.; Koblentz, J.; Dehlendorf, C.: Women’s Social Communication About IUDs: A Qualitative Analysis. *Perspectives on Sexual and Reproductive Health* **46**:3, 141–148 (2014).
- (74) Kňazická, Z.; Lukáč, N.; Grén, A.; Formicki, G.; Massányi, P.: In Vitro Effects of Copper on the Motility and Viability of Spermatozoa. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* **1**:6, 1529–1539 (2012).
- (75) Araya, R.; Gómez-Mora, H.; Vera, R.; Bastidas, J. M.: Human Spermatozoa Motility Analysis in a Ringer’s Solution Containing Cupric Ions. *Contraception* **67**:2, 161–163 (2003).
- (76) Ortiz, M. E.; Croxatto, H. B.; Bardin, C. W.: Mechanisms of Action of Intrauterine Devices. *Obstetrical and Gynecological Survey* **51**:12, 42-51 (1996).
- (77) Joshi, S. G.: Accumulation of Macrophages in the Uterine Cavity of Baboons Bearing an Intrauterine Foreign Body (IUFB). *Contraception* **4**:1, 45–49 (1971).
- (78) Gao, J.; Li, Y.; Liu, J.; Gu, X.: Releasing of Cupric Ion of Three Types of Copper-Bearing Intrauterine Contraceptive Device in Simulated Uterine Fluid. *Journal of Reproduction and Contraception* **18**:1, 33–40 (2007).
- (79) Cao, B.; Xi, T.; Zheng, Y.: Release Behavior of Cupric Ions for TCU380A and TCU220C IUDs. *Biomedical Material* **3**:4, Art. No. 044114 (2008).
- (80) Bertuola, M.; Grillo, C. A.; Fernández Lorenzo de Mele, M.: Eradication of Burst Release of Copper Ions from Copper-Bearing IUDs by a Phytocompound-Based Electropolymeric Coating. *Materials Letters* **252**, 317–320 (2019).
- (81) Hubacher, D.; Chen, Pai-Lien, Ch.; Park, S.: Side Effects from the Copper IUD: Do They Decrease over Time? *Contraception* **79**:5, 356–362 (2009).
- (82) De la Cruz, D.; Cruz, A.; Arteaga, M.; Castillo, L.; Tovalín, H.: Blood Copper Levels in Mexican Users of the T380A IUD. *Contraception* **72**:2, 122–125 (2005).

- (83) Oster, G. K.: Chemical Reactions of the Copper Intrauterine Device. *Fertility and Sterility* **23**:1, 18–23 (1972).
- (84) Grillo, C. A.; Reigosa, M. A.; Fernández Lorenzo de Mele, M. A.: Does Over-Exposure to Copper Ions Released from Metallic Copper Induce Cytotoxic and Genotoxic Effects on Mammalian Cells? *Contraception* **81**:4, 343–349 (2010).
- (85) Arnal, N.; de Alaniz, M. J. T.; Marra, C. A.: Alterations in Copper Homeostasis and Oxidative Stress Biomarkers in Women Using the Intrauterine Device TCu380A. *Toxicology Letters* **192**:3, 373–378 (2010).
- (86) Michel, H.; Behr, J.; Kannt, A.: Cytochrome c Oxidase: Structure and Spectroscopy. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **27**, 329–356 (1998).
- (87) Solano, F.: On the Metal Cofactor in the Tyrosinase Family. *International Journal of Molecular Sciences* **19**:2, Art. No. 633 (2018).
- (88) Korytowski, W.; Sarna, T.: Bleaching of Melanin Pigments. Role of Copper Ions and Hydrogen Peroxide in Autooxidation and Photooxidation of Synthetic Dopa-Melanin. *Journal of Biological Chemistry* **265**:21, 12410–12416 (1990).
- (89) Altobelli, G. G.; Van Noorden, S.; Balato, A.; Cimino, V.: Copper/Zinc Superoxide Dismutase in Human Skin: Current Knowledge. *Frontiers in Medicine* **7**, Art. No. 183 (2020).
- (90) Wazir, S. M.; Ghobrial, I.: Copper Deficiency, a New Triad: Anemia, Leucopenia, and Myeloneuropathy. *Journal of Community Hospital and Internal Medicine Perspective*, **7**:4, 265–268 (2017).
- (91) Rodriguez-Castro, K. I.; Hevia-Urrutia, F. J.; Sturniolo, G. C.: Wilson’s Disease: A Review of What We Have Learned. *World Journal of Hepatology* **7**:29, 2859–2870 (2015).
- (92) Hoffmann, E. de; Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications* [online]. John Wiley & Sons, 2007 [cit. 21.7.2022]. Dostupné z <http://www.usp.br/massa/2014/qfl2144/pdf/MassSpectrometry.pdf>.
- (93) Konermann, L.; Ahadi, E.; Rodriguez, A. D.; Vahidi, S.: Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. *Analytical Chemistry* **85**:1, 2–9 (2013).
- (94) Chung Shun Ho; Christopher Wai-kei Lam; Michael H. M. Chan; LK Law; Lydia C. W. Lit; Khuen Foong Ng; Michael W. M. Suen; H. L. Tai.: Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clinical Biochemist Reviews* **24**:1, 3–12 (2003).

- (95) Zins, E.-L.; Pepe, C.; Schröder, D.: Energy-Dependent Dissociation of Benzylpyridinium Ions in an Ion-Trap Mass Spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* **45**:11, 1253–1260 (2010).

- (96) Jaklová Dytrtová, J. J.; Jakl, M.; Schröder, D.; Čadková, E.; Komárek, M.: Complexation between the Fungicide Tebuconazole and Copper(II) Probed by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **25**:8, 1037–1042 (2011).