UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie

Bc. Johanka Jarošová

VYUŽITÍ KOMERČNÍ PEVNÉ BISMUTOVÉ KAPKOVÉ ELEKTRODY PŘI STANOVENÍ LÉČIVA NIFEDIPINU

Application of a Commercial Solid Bismuth Drop Electrode in the Determination of the Drug Nifedipine

Diplomová práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Praha 2025

Tato diplomová práce byla vypracována v rámci Specifického vysokoškolského výzkumu (projekt SVV).

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 je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 16. května 2025

Poděkování

Na prvním místě bych ráda poděkovala svému školiteli, prof. RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D., za ochotu, odborné vedení, cenné rady a trpělivost po celou dobu zpracování mé diplomové práce. Ráda bych také poděkovala všem členům laboratoře č. 113 za srdečné přijetí do kolektivu a za příjemné pracovní prostředí.

Dále děkuji svým přátelům a snoubenci za podporu během studia i mimo něj. A v neposlední řadě děkuji své rodině za neustálou podporu a oporu po celou dobu studia.

Abstrakt

Předmětem předkládané diplomové práce bylo studium komerčně dostupné pevné bismutové kapkové elektrody (SBiDE) a její využití pro optimalizaci podmínek pro voltametrické stanovení léčiva nifedipinu za použití techniky diferenční pulzní voltametrie (DPV) a „direct current" voltametrie (DCV).

Studium voltametrického chování léčiva nifedipinu bylo provedeno v závislosti na pH roztoku Brittonova-Robinsonova pufru s přídavkem ethanolu (BR pufr–EtOH) v objemovém poměru 9:1. Pro stanovení léčiva nifedipinu na SBiDE bylo vybráno optimální prostředí roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9, ve kterém byly proměřeny koncentrační závislosti nifedipinu v rozmezí $2 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}. Pro DPV mez stanovitelnosti (*LOQ*) činila 0,47 μmol l^{-1} a mez detekce (*LOD*) činila 0,14 μmol l^{-1}. Metodou DCV byla zjištěna hodnota *LOQ* 1,1 μmol l^{-1} a *LOD* 0,33 μmol l^{-1}.

Nově vyvinuté voltametrické metody byly pomocí metody přídavku standardu použity pro stanovení množství léčiva nifedipinu v lékové formě Cordipin XL. Zvolené voltametrické metody byly porovnány se srovnávací analytickou metodou UV–VIS absorpční spektrofotometrií v prostředí BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9. Nově vyvinuté voltametrické metody byly rovněž použity při stanovení léčiva nifedipinu v autentických vzorcích pitné a říční vody.

K charakterizaci elektrodového děje léčiva nifedipinu byla použita cyklická voltametrie. Aplikovatelnost diferenční pulzní adsorpční rozpouštěcí voltametrie (DPAdSV) byla ověřena při stanovení nifedipinu v nejnižším koncentračním rozsahu (1 – 10 μmol l^{-1}). Měření nejprve probíhalo s přídavkem ethanolu, kdy hodnota *LOQ* činila 0,80 μmol l^{-1} a *LOD* činila 0,24 μmol l^{-1}. Následně měření probíhalo bez přídavku ethanolu, kdy hodnota *LOQ* činila 0,52 μmol l^{-1} a *LOD* činila 0,16 μmol l^{-1}.

Aplikovatelnost roztoku siřičitanu sodného (Na_2SO_3) jako redukčního činidla pro odstranění kyslíku za dříve získaných optimálních podmínek byla ověřena metodou DPV při opětovném proměření kalibračních závislostí, při stanovení léčiva nifedipinu v lékové formě Cordipin XL, při stanovení léčiva nifedipinu v autentických vzorcích pitné a říční vody a při stanovení nifedipinu pomocí DPAdSV.

Abstract

The subject of the present Thesis was the study of a commercially available solid bismuth drop electrode (SBiDE) and its use to optimize the conditions for the voltammetric determination of the drug nifedipine using differential pulse voltammetry (DPV) and direct current voltammetry (DCV) techniques.

The voltammetric behaviour of the drug nifedipine was studied as a function of pH of Britton-Robinson buffer solution with the addition of ethanol (BR buffer–EtOH) in the volume ratio of 9:1. For the determination of the drug nifedipine on SBiDE, the optimum medium of BR buffer–EtOH solution was selected at pH 9:1, in which the concentration dependence of nifedipine was measured in the range of 2×10^{-6} – 1×10^{-4} mol L^{-1}. For DPV, the limit of quantification (*LOQ*) was 0.47 μmol L^{-1} and the limit of detection (*LOD*) was 0.14 μmol L^{-1}. The DCV method showed *LOQ* values of 1.1 μmol L^{-1} and *LOD* values of 0.33 μmol L^{-1}.

The newly developed voltammetric methods were applied to the quantification of nifedipine in the pharmaceutical form Cordipine XL using the standard addition method. The selected voltammetric methods were compared with a comparative analytical method by UV-VIS absorption spectrophotometry in BR buffer-EtOH medium at pH 9:1. The newly developed voltammetric methods were also applied to the determination of the drug nifedipine in authentic drinking and river water samples.

Cyclic voltammetry was used to characterize the electrode process of the drug nifedipine. The applicability of differential pulse adsorption stripping voltammetry (DPAdSV) was verified in the determination of nifedipine in the lowest concentration range (1 – 10 μmol L^{-1}). The measurement was first carried out with the addition of ethanol, where the *LOQ* was 0.80 μmol L^{-1} and the *LOD* was 0.24 μmol L^{-1}. Subsequently, the measurement was carried out without the addition of ethanol, where the *LOQ* was 0.52 μmol L^{-1} and the *LOD* was 0.16 μmol L^{-1}.

The applicability of sodium sulphite solution (Na_2SO_3) as a reducing agent for oxygen removal was verified under previously obtained optimum conditions by DPV in the re-measurement of calibration dependences, in the determination of nifedipine in the dosage form Cordipine XL, in the determination of nifedipine in authentic drinking and river water samples, and in the determination of nifedipine by DPAdSV.

Klíčová slova

Diferenční pulzní voltametrie

„Direct current“ voltametrie

Nifedipin

Analýza léčiv

Pevná bismutová kapková elektroda

UV–VIS absorpční spektrofotometrie

Autentické vzorky pitné a říční vody

Diferenční pulzní adsorpční rozpouštěcí voltametrie

Cyklická voltametrie

Siřičitan sodný

Key Words

Differential Pulse Voltammetry

Direct Current Voltammetry

Nifedipine

Drug Analysis

Solid Bismuth Drop Electrode

UV–VIS Absorption Spectrophotometry

Authentic Samples of Drinking and River Water

Differential Pulse Adsorptive Stripping Voltammetry

Cyclic Voltammetry

Sodium Sulphite

Seznam použitých zkratek

A	absorbance
AgE	stříbrná elektroda
AgNPs/GCE	elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná stříbrnými nanočásticemi
AuE	zlatá elektroda
β-CD-CNT-PE	pastová elektroda z uhlíkových nanotrubiček modifikovaná β-cyklodextrinem
BiBE	bismutová pevná elektroda
BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda
Bi/Pt	platinová elektroda modifikovaná pevným bismutem
BiO_x/Bi/Pt	platinová elektroda modifikovaná oxidy bismutu a pevným bismutem
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
c	molární koncentrace [mol l^{-1}]
CMCPE	uhlíková pastová elektroda modifikovaná jílem
DCV	„direct current“ voltametrie
DPAdSV	diferenční pulzní adsorpční rozpouštěcí voltametrie
DPAdSV–EtOH	diferenční pulzní adsorpční rozpouštěcí voltametrie v prostředí s přídavkem ethanolu
DPV	diferenční pulzní voltametrie
E	elektrodový potenciál [mV]
E_{akum}	akumulační elektrodový potenciál [mV]
E_{akum_EtOH}	akumulační elektrodový potenciál s v prostředí přídavkem ethanolu [mV]
E_{fin}	konečný elektrodový potenciál [mV]
E_{fin_r}	konečný regenerační elektrodový potenciál [mV]
E_{in}	počáteční elektrodový potenciál [mV]
E_{in_r}	počáteční regenerační elektrodový potenciál [mV]
E_p	elektrodový potenciál píku [mV]
FTO	skleněný substrát dopovaný fluorem a oxidem cínu
GCE	elektroda ze skelného uhlíku

GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrickou detekcí
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
HMDmE	visící rtuťová kapková minielektroda
HPLC-MS/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie se dvěma detektory hmotnostní spektrometrie
I	elektrický proud [nA]
I_p	elektrický proud píku [nA]
λ	vlnová délka [nm]
k	směrnice [l mol^{-1}]
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie se dvěma detektory hmotnostní spektrometrie
L-cystein/AuE	zlatá elektroda modifikovaná L-cysteinem
L-cystein/GCE	elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná L-cysteinem
LOD	mez detekce [mol l^{-1}]
LOQ	mez stanovitelnosti [mol l^{-1}]
m	hmotnost látky [mg]
m	počet protonů
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda
MgO-SPEs	sítotiskové elektrody modifikované nanodestičkami MgO
MWCNT/GCE	elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná vícestěnnými uhlíkovými nanotrubicemi
MWCNTs /β-CD/PE	pastová elektroda modifikovaná vícestěnnými uhlíkovými nanotrubicemi a β-cyklodextrinem
n	počet měření
n	počet neutronů
N	pořadové číslo měření
p-AgSAE	leštěná stříbrná pevná amalgamová elektroda
PFF/GCE	elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná polyfurfurylovým filmem
PVP/CPE	uhlíková pastová elektroda modifikovaná polyvinylpyrrolidonem
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů

r	korelační koeficient
SBiDE	pevná bismutová kapková elektroda
SWAdSV	„square-wave“ adsorpční rozpouštěcí voltametrie
SWV	„square-wave“ voltametrie
t_{akum}	akumulační čas [s]
t_{akum_EtOH}	akumulační čas v prostředí s přídavkem ethanolu [s]
(U)HPLC-UV	(ultra)vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detektorem
UV–VIS	ultrafialová a viditelná oblast
V/*V*	objemový zlomek [%]
v	rychlost polarizace [mV s^{-1}]
w	hmotnostní zlomek [%]
ZnONPs/CNTs/GCE	elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná nanočásticemi ZnO a uhlíkovými nanotrubicemi

Obsah

1. Teoretická část 12
1.1 Cíle práce 12
1.2 Pevná bismutová elektroda a její využití v organické analýze 13
1.2.1 Pevná bismutová kapková elektroda 14
1.3 Kapalná bismutová elektroda 14
1.4 Využití bismutových elektrod při měření pH 15
1.5 Nifedipin 17
2. Experimentální část 20
2.1 Reagencie 20
2.2 Aparatura 20
2.3 Pracovní postupy 21
2.3.1 Voltametrie 21
2.3.2 Spektrofotometrie 22
2.3.3 Čištění a aktivace SBiDE 23
2.3.4 Vyhodnocení výsledků a statistické zpracování dat 24
3. Výsledky a diskuse 27
3.1 Diferenční pulzní voltametrie 27
3.1.1 Vliv pH 27
3.1.2 Vliv regenerace povrchu SBiDE 29
3.1.3 Kalibrační závislost 31
3.2 DC voltametrie 34
3.2.1 Vliv pH 34
3.2.2 Vliv regenerace povrchu SBiDE 36
3.2.3 Kalibrační závislost 38
3.3 Voltametrické stanovení nifedipinu v lékové formě 41
3.4 Spektrofotometrické stanovení nifedipinu v lékové formě 44
3.5 Stanovení nifedipinu v autentických vzorcích pitné a říční vody 46
3.6 Cyklická voltametrie 49
3.7 Adsorpční rozpouštěcí voltametrie 53
3.8 Odstranění kyslíku pomocí nasyceného roztoku siřičitanu sodného 56
3.8.1 Kalibrační závislosti 57
3.8.2 Voltametrické stanovení nifedipinu v lékové formě 60

3.8.3 Stanovení nifedipinu v autentických vzorcích pitné vody 62
3.8.4 Adsorpční rozpouštěcí voltametrie 63
3.9 Porovnání výsledků prvního a druhého měření na SBiDE po časovém odstupu 65
3.10 Závěr 67
4. Literatura 70

1. Teoretická část

Tato diplomová práce navazuje na bakalářskou práci Využití pevné bismutové kapkové elektrody při stanovení léčiva metronidazolu (Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha 2023). Bakalářská práce se zabývala studiem nové pevné kapkové bismutové elektrody (SBiDE) a jejím využitím k optimalizaci podmínek pro stanovení léčiva metronidazolu pomocí techniky diferenční pulzní voltametrie (DPV).

Voltametrické chování léčiva metronidazolu bylo zkoumáno v roztoku Brittonova-Robinsonova pufru (BR pufr) o různém pH. Jako optimální prostředí pro stanovení léčiva metronidazolu pomocí SBiDE byl zvolen BR pufr o pH 12, v němž byly měřeny koncentrační závislosti metronidazolu v rozmezí $1 \cdot 10^{-6} – 6 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}. Technikou DPV byla zjištěna hodnota *LOQ* $1{,}4 \cdot 10^{-6}$ mol l^{-1} a *LOD* $4{,}4 \cdot 10^{-7}$ mol l^{-1}.

Vyvinutá voltametrická metoda byla aplikována na stanovení metronidazolu v infuzním roztoku Efloran 500 mg/100 ml, tabletě Entizol 250 mg, vaginální tabletě Entizol 500 mg a v infuzním roztoku Noridem 500 mg/100 ml. Naměřené výsledky byly porovnány s hodnotami získanými pomocí srovnávací analytické metody UV–VIS absorpční spektrofotometrie v prostředí BR pufru o pH 12 (cit. [1]).

1.1 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo využití nové komerční pevné bismutové kapkové elektrody (SBiDE) pro stanovení léčiva nifedipinu.

Dalším cílem byla aplikace nově vyvinutých metod (DPV, DCV) při stanovení nifedipinu v lékové formě Cordipin XL a následné srovnání získaných výsledků těchto stanovení se srovnávací analytickou metodou, v tomto případě s UV–VIS absorpční spektrofotometrií.

Dalšími cíli bylo stanovit léčivo nifedipin v autentických vzorcích pitné a říční vody, aplikovat adsorpční rozpouštěcí voltametrii pro nahromadění nifedipinu na povrch elektrody před samotnou analýzou pro získání vyšší proudové odezvy, zkoumat mechanismus redukce nifedipinu pomocí cyklické voltametrie a použít roztok siřičitanu sodného jako redukční činidlo pro odstranění kyslíku z analyzovaných vzorků.

1.2 Pevná bismutová elektroda a její využití v organické analýze

Pevná bismutová elektroda (BiBE) je nejjednodušší bismutovou elektrodou pro organickou analýzu[2]. Nejčastěji je vyrobena z bismutového drátku obaleného vhodným izolantem[3], případně nasátím roztaveného bismutu do hrotu Pasteurovy pipety, čímž vznikne po vyleštění pevný bismutový disk[4,5,6]. Pomocí BiBE bylo stanoveno několik organických látek jako např. nitrofenol, nitrobenzaldehyd, nitrobenzoová kyselina, parathion[6], daunomycin[7], 5-nitroindazol[8], 2-methyl-4,6-dinitrofenol[9], clothianidin[10] a 2,4,6-trinitrofenol[11].

Přestože je bismut velmi vhodným materiálem pro stanovení redukovatelných organických látek, v této oblasti zatím existuje poměrně málo aplikací a často se uplatňují elektrody z jiných materiálů. V tabulce 1.1 jsou vypsány příklady stanovených organických sloučenin pomocí pevných elektrod z různých materiálů.

Tabulka 1.1

Příklady stanovení organických látek pomocí pevných elektrod z různých materiálů.

Elektroda	Látka	Lit.
AgE	metronidazol	12
SBiDE		13
GCE, AuE	duloxetin hydrochlorid	14
AuE	ticaglerol	15
L-cystein/AuE L-cystein/GCE	askorbová kyselina	16
m-AgSAE	methylová modř	17
	4-nitroanilin	18
p-AgSAE	trifluralin	19
	listová kyselina	5

1.2.1 Pevná bismutová kapková elektroda

Pevná bismutová kapková elektroda (SBiDE, z anglického výrazu „solid bismuth drop electrode“, obr. 1.1) je nová pracovní elektroda, která je vhodnou ekologickou alternativou k tradičním rtuťovým elektrodám. Od roku 2020 je tato elektroda dodávána na český trh společností Metrohm ČR. SBiDE tvoří 2mm kapka bismutu na konci zúžené skleněné kapiláry, jejíž povrch slouží jako aktivní elektrodová plocha pro elektrochemická měření. Díky pevné kapce bismutu je tato elektroda stabilní a umožnuje opakované použití. Dle výrobce je vhodná pro přímé stanovení těžkých kovů v jezerech, řekách, vodonosných vrstvách, podzemních vodách a zejména v kontaminované pitné vodě. Měření lze provádět v rozsahu nízkých koncentrací od µg l^{-1}, někdy až od koncentrace ng l^{-1}. Z důvodu ochrany elektrody před mechanickým poškozením se její aktivace a čištění provádí výhradně elektrochemicky[20,21].

Obr. 1.1 Pevná bismutová kapková elektroda (SBiDE) vyrobena společností Metrohm (převzato z cit.[20]).

1.3 Kapalná bismutová elektroda

Kapalné kovy jsou čím dál více využívány jako pracovní elektrody v oblasti jaderné chemie. Je to hlavně díky konstantní ploše elektrody a úplné fyzické separaci mezi elektrolytem a produkovaným kovem. Pomocí elektrochemického výzkumu prováděného technikou lineární voltametrie byly elektrody z kapalného kovu seřazeny podle reaktivity (Sb > Bi > Pb > Sn > Ga > Mo) a podle ušlechtilosti (Ga < Sn < Pb < Sb < Bi < Mo)[22].

Kapalná bismutová elektroda je vyráběna roztavením pevného bismutu v alundovém kelímku[23,24], v kelímku z nitridu hliníku[25], nebo může být vytvořena roztavením pevného bismutu v Pyrexové trubici ve tvaru J (cit.[26,27]). Elektrický kontakt je zajištěn zavedením

vodivého drátku přímo do roztaveného bismutu[23] (např. pomocí wolframového[26], molybdenového[25,24] nebo stříbrného[27] drátku). Takto připravená elektroda je využívána při vysokoteplotní elektrochemii nebo při měření v prostředích s roztavenými solemi. Jako elektrolyt při vysokých teplotách se nejčastěji využívá eutektická směs LiCl–KCl. Pro ochranu povrchu pracovní elektrody se měření provádějí v atmosféře inertního plynu, obvykle v argonu[23–27]. Pomocí kapalné bismutové elektrody bylo zkoumáno chování např. Th^{4+} (cit.[23]), La^{3+} (cit.[26]), Np^{3+} (cit. [25]), Pu^{3+} (cit. [24]) nebo Pr^{3+} (cit. [27]).

1.4 Využití bismutových elektrod při měření pH

Pro měření pH se nejčastěji používají konvenční skleněné elektrody z důvodu jejich vysoké citlivosti, selektivity a dlouhodobé stability. Přestože mají několik výhod, existují tu i některé nevýhody jako např. mechanická křehkost, potřeba vnitřních roztoků, vysoká cena nebo způsob skladování. Pro odstranění těchto nevýhod byly v elektrodách pro snímání pH použity různé oxidy kovů[28] jako např. TiO_2 (cit.[29]), Ta_2O_5 (cit.[30]), PbO_2 (cit.[31]), WO_3 (cit.[32]) nebo IrO_2 (cit.[33]). A to z důvodu jejich jedinečných elektrochemických vlastností, zahrnujících mimořádnou stabilitu a rozsáhlý povrch[34], díky nimž se pH elektrody staly více citlivé, došlo ke zvýšení katalytické aktivity a selektivity[35]. Tyto oxidy kovů se připravují jako pracovní elektrodový substrát pomocí různých technik, jako jsou např. dynamická oxidační elektrodová depozice[33], sítotisk[36] nebo sol-gelové techniky[29].

Dále byl pro snímání pH použit oxid bismutitý (Bi_2O_3), jehož tenká vrstva byla nanášena technikou sprejové pyrolýzy při 55 °C po dobu 10 minut na skleněný substrát dopovaný fluorem a oxidem cínu (FTO). Membrána na bázi Bi_2O_3/FTO byla vyrobena a použita pro vývoj miniaturní selektivní a citlivé elektrody pro měření pH v rozsahu pH 2 – 12. Tato nově vyrobená elektroda byla úspěšně použita pro hodnocení pH různých přírodních vzorků a dosáhla téměř shodných výsledků s výsledky získaných standardní skleněnou elektrodou[37].

Pro snímání pH v silně alkalických roztocích KOH o pH 14 – 16 byly vyvinuty platinové elektrody Bi/Pt a BiO_x/Bi/Pt. Obě vyvinuté elektrody jsou vhodné pro krátkodobé měření pH (15 – 30 min) v koncentrovaných roztocích KOH, po této době dochází k pozorovatelnému driftu napětí. Elektrody je proto nutné před každým experimentem kalibrovat[38].

Dalším typem elektrody pro měření pH je BiBE. Kuličky pevného bismutu byly připraveny zahříváním bismutového prášku v elektrické peci, kterou procházel proud CO_2, aby nedošlo k oxidaci. Následně roztavením kuliček byly vyrobeny pevné bismutové elektrody. Takto vzniklé elektrody měly vysoce leštěný vzhled a jejich povrch byl bez oxidů. Pro dosažení reprodukovatelných výsledků byla nezbytná přítomnost vrstvy oxidu bismutitého na povrchu elektrody. Vrstva oxidu byla získána ponecháním elektrody na vzduchu po dobu několika dní, nebo ponořením elektrody do roztoku dusičnanu bismutitého a následným jemným zahřátím v Bunsenově plameni. Takto vyrobené BiBE jsou vhodné pro měření pH v rozmezí pH 5 – 8 (cit.[39]).

1.5 Nifedipin

Nifedipin, neboli 3,5-dimethyl-2,6-dimethyl-4-(2-nitrofenyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dikarboxylát, je žlutý krystalický prášek těžko rozpustitelný ve vodě a snadno rozpustitelný v ethanolu[40]. Jedná se o blokátor kalciových kanálů patřící do skupiny dihydropyridinů[41]. Nifedipin byl původně vyvinut a uveden na trh v polovině 70. let 20. století jako profylaktické opatření proti příznakům anginy pectoris. Později se začal využívat jako antihypertenzivum – farmakum pro léčbu vysokého krevního tlaku[42,43] nebo pro léčbu Raynaudovy choroby a dalších kardiovaskulárních poruch[44]. Primárním farmakodynamickým účinkem je rozšíření velkých a malých tepen, a to snížením napětí hladkého svalstva v jejich stěnách[42,45,46].

Tableta nifedipin je tvořena dvoukomorovým jádrem, obsahujícím osmotické jádro s léčivem a polymerovou vrstvou s osmoticky aktivním polymerem, který při kontaktu s vodou bobtná. Dále tableta obsahuje polopropustnou membránu, která obklopuje tabletu, a laserem vytvořený otvor, který umožnuje řízené uvolňování suspenze léčiva, tzv. osmotický systém „push-pull“. Ten spočívá v tom, že voda nejprve proniká přes polopropustnou membránu do osmotického jádra obsahujícího nifedipin, kde dochází k vytvoření suspenze. Současně dochází k rozpínání polymerové vrstvy, jejíž tlak následně vytlačuje léčivo skrz laserem vytvořený otvor do trávicího traktu, kde je zcela vstřebáno[46].

Nifedipin je vysoce nepolární sloučenina a v játrech prochází tzv. first-pass efektem, kde je metabolizován pomocí cytochromu P450 na polárnější sloučeniny[41,44,47,48]. Dochází tak k oxidativní biotransformaci na farmakologicky neaktivní metabolity[41,44]. Vzniklé sloučeniny jsou primárně vyloučeny močí[44].

V literatuře jsou jako nejčastější metody pro stanovení nifedipinu uváděny separační metody HPLC-MS/MS[49], LC-MS/MS[50], (U)HPLC-UV[51,52], GC-MS[53] a spektrometrická metoda UV-VIS spektrofotometrie[54]. Příklady voltametrických stanovení nifedipinu jsou uvedeny v tabulce 1.2.

Přítomnost nifedipinu lze ověřit lékopisnou metodou, která se skládá ze čtyř hlavních kroků. Prvním krokem je detekce pomocí teploty tání, která se pohybuje v rozmezí 171 – 175 °C. Druhým krokem je detekce pomocí infračerveného absorpčního spektra, kde se zkoušené látky shodují se spektrem nifedipinu (standard). Pevné látky se pro infračervenou absorpční spektrometrii připravují jako suspenze ve vhodné kapalině nebo

ve formě halogenidové tablety. Třetím krokem je detekce pomocí tenkovrstvé chromatografie. Používá se zde vrstva vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem při detekci při 254 nm. Pro detekci tenkovrstvou chromatografií se připravuje zkoušený roztok (10 mg látky se kvantitativně převede do 10ml odměrné baňky, která je methanolem doplněna po rysku) a porovnávací vzorek (10 mg nifedipinu (standard) se kvantitativně převede do 10ml odměrné baňky, která je methanolem doplněna po rysku). Na vrstvu vhodného silikagelu se nanese 5 µl ze zkoušeného a porovnávacího roztoku. Takto připravená chromatografická vrstva se následně vyvíjí v chromatografické cele za použití nenasycené směsi ethylacetátu a cyklohexanu v poměru 40:60 (*V*/*V*), a to po dráze 15 cm. Chromatografická deska se následně na vzduchu usuší a poté se pozoruje v UV světle při 254 nm. Čtvrtým krokem lze provést důkazovou reakci. Do zkumavky se kvantitativně převede 25 mg látky, 1,5 ml kyseliny chlorovodíkové (10%), 3,5 ml deionizované vody, 5 ml ethanolu a mírným zahřátím se směs rozpustí. Následně se do rozpuštěné směsi přidá 0,5 g granulovaného zinku a za občasného míchání se směs nechá stát po dobu 5 minut. Odstátý roztok se přefiltruje do další zkumavky a k vzniklému filtrátu se přidá 5 ml dusitanu sodného (10 g l^{-1}). Roztok se nechá stát po dobu 2 minut. Poté se k němu přidají 2 ml hydrogenuhličitanu amonného (50 g l^{-1}) a po silném protřepání se k roztoku přidají ještě 2 ml naftylethylendiamonium dichloridu (5 g l^{-1}). Vznik intenzivně červeného zbarvení, které přetrvává po dobu alespoň 5 minut, svědčí o přítomnosti nifedipinu ve zkoumané látce. Stanovení obsahu nifedipinu lékopisnou formou spočívá v rozpuštění 0,13 g látky ve směsi tvořené 25 ml terciálního buthanolu a 25 ml kyseliny chloristé (8,5 ml kyseliny chloristé (70 – 73%) je zředěno vodou na 100 ml). Do takto připraveného roztoku se přidá 0,1 ml feroinu (indikátor). Roztok je následně titrován tetrasulfatoceričitanem amonným (0,1 mol l^{-1}) do odbarvení růžového zabarvení. Pro výpočet množství nifedipinu ve vzorku odpovídá 1 ml tetrasulfatoceričitanu amonného (0,1 mol l^{-1}) 17,32 g nifedipinu[40].

Tabulka 1.2

Příklady stanovení nifedipinu pomocí voltametrických metod.

Elektroda	Metoda	Lineární rozsah [μmol l^{-1}]	*LOD* (ideální matrice) [μmol l^{-1}]	Matrice vzorku	Lit.
BDDE	DPV	3,98 – 107	0,61	tableta	55
CMCPE	DPAdSV	0,00046 – 20	0,00039	tableta, moč, sérum	56
AgNPs/GCE	DPV	0,8 – 60	0,72	tableta, lidská moč	57
m-AgSAE	DPV	0,2 – 20	0,36	pitná voda, říční voda	58
MWCNT/GCE	DPV	0,1 – 100	0,017	moč, tableta	59
β-CD-CNT-PE	DPAdSV	0,048 – 20	0,015	moč, sérum	60
HMDE	SWAdSV	0,002 – 20	0,00034	tableta	61
HMDE	DPAdSV	0,002 – 0,1	0,012	krevní sérum	62
HMDE	SWAdSV	0,0029 – 0,36	0,0012	plazma	63
HMDmE	DPV	0,2 – 20	0,036	pitná voda, říční voda	58
MgO–SPEs	DPV	0,2 – 104,4	0,032	tableta, lidská moč	64
MWCNTs /β-CD/PE	DPV	0,07 – 15	0,025	tableta, krevní sérum	65
PFF/GCE	DPAdSV	0,01 – 7	0,005	lidská moč, tableta	66
PVP/CPE	DPV	0,075 – 50	0,02	tableta	67
ZnONPs/CNTs/GCE	SWV	0,001 – 40	0,00049	lidská moč, krevní sérum	68

2. Experimentální část

2.1 Reagencie

Zásobní roztok nifedipinu (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Německo) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1} byl připraven rozpuštěním 8,66 mg ve 25 ml absolutního ethanolu (p.a., Penta, Praha, ČR) a uchováván ve tmě a chladu.

Brittonovy-Robinsonovy (BR) pufry byly připraveny smícháním roztoku pevného hydroxidu sodného (zásaditá složka) o koncentraci 0,2 mol l^{-1} (p.a. Penta, Praha, ČR) s kyselou složkou o koncentraci všech kyselin 0,04 mol l^{-1}, která obsahovala naředěnou 85% kyselinu trihydrogenfosforečnou (p.a., Lach:Ner, Neratovice, ČR), rozpuštěnou pevnou kyselinu boritou (p.a., Lach:Ner, Neratovice, ČR) a naředěnou 99,8% octovou kyselinu (p.a., Penta, Praha, ČR). Pro přípravu pufrů a dalších vodných roztoků byla použita deionizovaná voda produkovaná systémem Milli-Q Plus (Millipore, Billerica, MA, USA).

Léčivo Cordipin XL (KRKA, Novo Mesto, Slovinsko) bylo použito pro voltametrické a spektrofotometrické stanovení obsahu nifedipinu v lékové formě.

Pro optimalizaci stanovení nifedipinu v modelovém prostředí vzorků pitné a říční vody byl připraven roztok dihydrátu disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny (Na_2EDTA, popř. chelaton III) o koncentraci 0,1 mol l^{-1} (p.a., Penta, Praha, ČR).

Nasycený roztok siřičitanu sodného (p.a., Lach:Ner, Neratovice, ČR) byl připraven rozpuštěním 2,53 g v 10 ml deonizované vody.

Čistící roztok byl připraven kvantitativním převedením 10 ml hydroxidu sodného (p.a. Penta, Praha, ČR) o koncentraci c = 1 mol l^{-1}, 1,32 ml triethanolaminu (p.a., Avondale Laboratories, Banbury, Velká Británie) a 6,7 g bromičnanu draselného (p.a., Reanal, Maďarsko) do 100ml odměrné baňky, která byla doplněna deionizovanou vodou po rysku. Dále byla k čištění použita 65% kyselina dusičná (p.a., Lach:Ner, Neratovice, ČR).

2.2 Aparatura

Voltametrická měření byla uskutečněna pomocí analyzátoru Eco-Tribo Polarograf (v Microsoft Windows XP Professional, verze 2002), který byl řízen programem Polar Pro verze 5.1 (Eco-Trend Plus, Praha, ČR). Bylo použito tříelektrodové zapojení s pracovní elektrodou SBiDE (průměr kapky 2 mm, typ 6.0346.000, Metrohm, Praha, ČR), referentní argentchloridovou elektrodou (typ 10-20+polaro Ag 10 10-2014-3,

3mol l^{-1} KCl, Elektrochemické Detektory, Turnov, ČR) a pomocnou platinovou elektrodou (ETP CZ P01306, Elektrochemické Detektory, Turnov, ČR).

Při měření technikou DPV byly na pracovní elektrodu vkládány pulzy o šířce 100 ms (proud vzorkován posledních 20 ms), s periodou pulzu 150 ms a výškou pulzu −50 mV. Rychlost polarizace činila 20 mV s^{-1} a potenciálový krok byl 3 mV. Při měření technikou DCV rychlost polarizace činila 20 mV s^{-1} a potenciálový krok byl 3 mV.

Spektrofotometrická měření byla uskutečněna prostřednictvím přístroje Agilent 8453 v programu UV–Visible ChemStation verze 9.01 (obojí Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Vodné roztoky BR pufru o různém pH byly připraveny prostřednictvím pH metru Jenway 3510 (Jenway, Essen, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou.

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Voltametrie

Při zkoumání vlivu pH, měření kalibračních závislostí, voltametrickém stanovení množství nifedipinu v lékové formě Cordipin XL, cyklické voltametrii a při odstraňování kyslíku pomocí siřičitanu sodného byly připraveny roztoky vodného roztoku BR pufru s ethanolem v objemovém poměru 9:1 (převzato z bakalářské práce: Voltametrické stanovení léčiva nifedipin na grafitové kompozitní elektrodě[69]).

Při zkoumání vlivu pH byly připraveny 10ml roztoky (9 ml vodného roztoku BR pufru o příslušném pH a 1 ml zásobního roztoku nifedipinu), které byly následně kvantitativně převedeny do voltametrické nádobky a probublány dusíkem (z centrálního rozvodu v budově Chemického ústavu PřF UK Praha, Linde Gas, Praha) po dobu 3 minut. Dusík byl přiváděn přes promývačku s deonizovanou vodou a ethanolem v objemovém poměru 9:1. Základní elektrolyt byl tvořen 9 ml vodného roztoku BR pufru o příslušném pH s 1 ml ethanolu (objemový poměr 9:1).

Kalibrační závislosti byly měřeny s 10ml roztoky vodného roztoku BR pufru o optimální hodnotě pH s ethanolem (9:1) a příslušným množstvím zásobního roztoku nifedipinu. Tyto roztoky byly kvantitativně převedeny do voltametrické nádobky a probublány dusíkem po dobu 3 minut.

Voltametrické stanovení množství nifedipinu bylo prováděno v tabletě Cordipin XL. Tableta byla zvážena a v třecí misce rozetřena. Zásobní roztok lékové formy Cordipin XL byl připraven kvantitativním převedením 13,69 mg rozetřené tablety do 25ml odměrné

baňky, která byla doplněna ethanolem po rysku. Takto připravený zásobní roztok byl přefiltrován přes filtrační nástavec na injekční stříkačku (FP 030/2, 0,45 μm, Schleicher & Schuell, Einbeck, Německo). Voltametrické měření bylo prováděno s 10ml vzorky vodného roztoku BR pufru o optimální hodnotě pH s ethanolem (9:1), příslušným množstvím zásobního roztoku léčiva a standardu nifedipinu. Vzorky byly kvantitativně převedeny do voltametrické nádobky a probublány dusíkem po dobu 3 minut.

Pro stanovení nifedipinu v modelovém prostředí vzorků pitné a říční vody byly připraveny 10ml roztoky (1 ml vodného roztoku BR pufru o optimální hodnotě pH, příslušné množstvím zásobního roztoku nifedipinu, 100 μl roztoku 0,1mol l^{-1} Na_2EDTA a vzorek pitné nebo říční vody). Vzorky byly kvantitativně převedeny do voltametrické nádobky a probublány dusíkem po dobu 3 minut.

Cyklická a adsorpční rozpouštěcí voltametrie byla měřena s 10ml roztoky vodného roztoku BR pufru o daném pH s odpovídajícím množstvím zásobního roztoku nifedipinu. Cyklická voltametrie byla měřena s přídavkem ethanolu, jehož celkový objem v roztoku byl roven 1 ml. Adsorpční rozpouštěcí voltametrie byla měřena s přídavkem ethanolu (celkový objem v roztoku roven 1 ml) a bez přídavku ethanolu. Vzorky byly kvantitativně převedeny do voltametrické nádobky a probublány dusíkem po dobu 3 minut.

Při odstraňování kyslíku pomocí siřičitanu sodného byly připraveny 10ml roztoky vodného roztoku BR pufru o optimální hodnotě pH s ethanolem (9:1), příslušným množstvím zásobního roztoku nifedipinu a 100 μl nasyceného roztoku siřičitanu sodného.

V programu Polar Pro 5.1 byly následně 10 – 15 krát proměřeny voltametrické křivky. Po ustálení signálu bylo posledních 5 křivek vyhodnoceno a získané výsledky byly statisticky zpracovány.

2.3.2 Spektrofotometrie

Jako analytická srovnávací metoda pro voltametrické stanovení nifedipinu v lékové formě Cordipin XL zde byla použita UV-VIS absorpční spektrofotometrie. Pro spektrofotometrická stanovení nifedipinu byly připraveny 10ml vzorky vodného roztoku BR pufru o optimální hodnotě pH s ethanolem (9:1) a příslušným množstvím zásobního roztoku léčiva a standardu nifedipinu. Měření probíhalo v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm proti vodnému roztoku BR pufru o optimální hodnotě pH s ethanolem (9:1). Absorbance připravených roztoku byla měřena v rozmezí vlnových délek 200 – 1100 nm.

Křivky absorpčních spekter byly 3krát měřeny v programu UV–Visible ChemStation 9.01, vyhodnoceny a získané výsledky byly statisticky zpracovány.

2.3.3 Čištění a aktivace SBiDE

Při uchovávání SBiDE na vzduchu, v samotné deonizované vodě či jiném běžném uchovávacím roztoku (např. nasycený roztok KCl) dochází ke zčernání jejího povrchu (pokrytí oxidem bismutitým). Pokud elektroda zčerná, je zapotřebí ji zaktivovat, tedy vyčistit. SBiDE je citlivá na mechanické zacházení, proto se musí čistit pouze elektrochemicky pomocí čistícího roztoku. Pokud je čištění elektrody pomocí tohoto roztoku neúspěšné, musí se elektroda vyčistit pomocí koncentrované kyseliny dusičné. V našem případě byla SBiDE před úplně prvním použitím zčernalá, protože byla ponechána neaktivní po dobu několika měsíců.

Čistící roztok byl připraven kvantitativním převedením 10 ml hydroxidu sodného (c = 1 mol l^{-1}), 1,32 ml triethanolaminu a 6,7 g bromičnanu draselného do 100ml odměrné baňky, která byla doplněna deionizovanou vodou po rysku. Čištění probíhalo pomocí metody cyklické voltametrie s parametry: E_{in} = 200 mV, E_{fin} = −1000 mV a rychlost polarizace 100 mV s^{-1} (cit.[70]). Měření bylo prováděno v cyklech po 20 křivkách.

Protože jsme měli obavu, aby nedošlo k poškození elektrody, zahájili jsme nejprve čištění pomocí čistícího elektrolytu. Čištění probíhalo po počtech cyklů, které jsme postupně navyšovali (1 – 10 cyklů). Různé kombinace cyklů byly testovány po dobu dvou dnů. Pro kontrolu, zda došlo k vyčištění elektrody, byly zaznamenávány DP voltamogramy léčiva metronidazol (c = $1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}) ve vodném roztoku BR pufru o pH 12 a porovnávány s výsledky získanými v předchozí bakalářské práci (viz bakalářská práce[1]). Po dvou dnech, kdy nedošlo k její dostatečné aktivaci, byla elektroda ponořena do roztoku koncentrované kyseliny dusičné po dobu 5 s. Po vyjmutí byla elektroda ještě jednou čištěna pomocí čistícího roztoku. Díky tomuto kroku se elektrodu podařilo dostatečně zaktivovat.

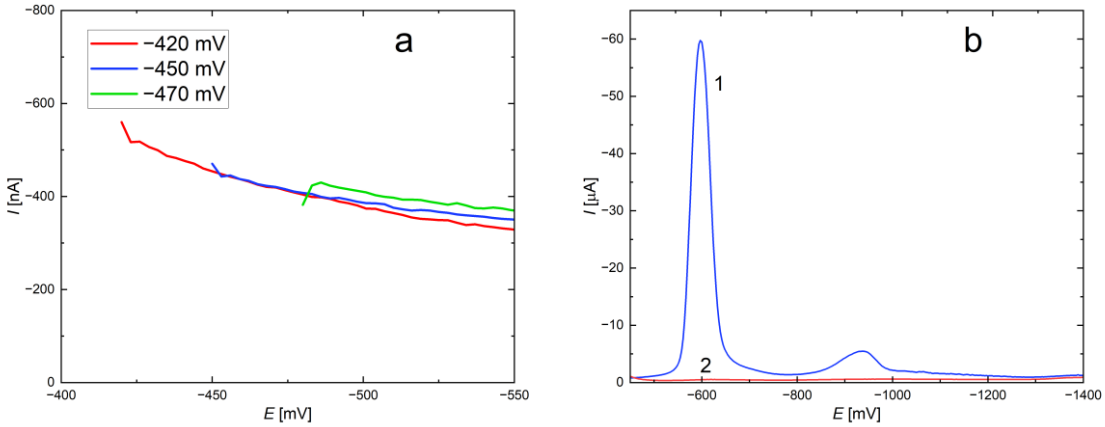
Povrch elektrody je velmi citlivý na styk se vzdušným kyslíkem a stále opakovaně docházelo k zbarvování jejího povrchu na šedou, zlatou či fialovou barvu. Z tohoto důvodu byla elektroda na začátku každého dne měření ve dvou cyklech čištěna pomocí čistícího roztoku.

2.3.4 Vyhodnocení výsledků a statistické zpracování dat

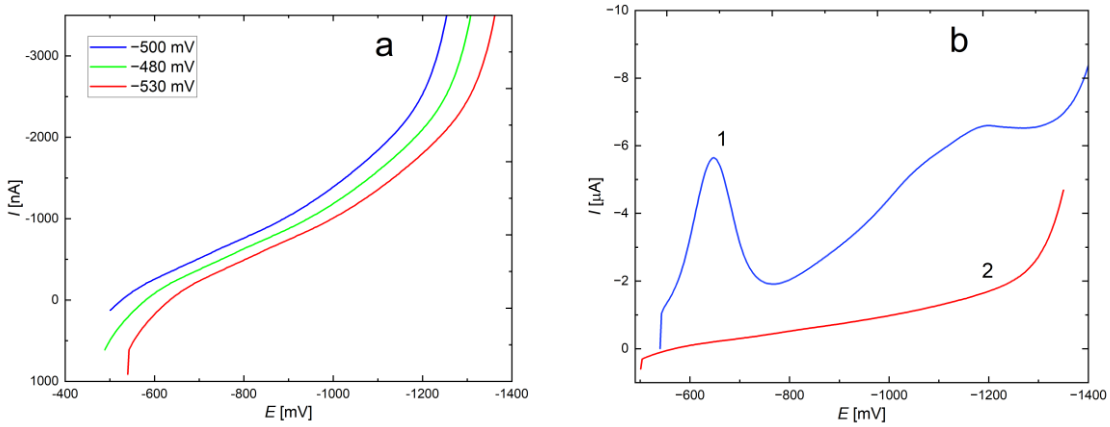
Před samotným zkoumáním vlivu pH byl nejprve určen počátek potenciálového okna tak, aby voltamogram základního elektrolytu vykazoval co nejnižší proud pozadí. Abychom zhodnotili chování elektrody, stanovili jsme nejprve šíři potenciálového okna v neutrálním prostředí (pH 7), následně jsme pokračovali v nalezení potenciálových oken pro pH 8 – 12, poté pro pH 2 – 6. Na obr. 2.1 (a) je znázorněn příklad určení počátku potenciálového okna pomocí techniky DPV v roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9. Hodnota počátku potenciálové okna byla stanovena na −450 mV. Na obr. 2.2 (a) je znázorněn příklad určení počátku potenciálového okna pomocí DCV v roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9. Hodnota počátku potenciálové okna byla stanovena na −500 mV. V tabulce 2.1 jsou uvedeny hodnoty šíře potenciálových oken pro jednotlivá prostředí o daných pH. Na obr. 2.1 (b) je zobrazen příklad prvního DPV měření na SBiDE. Na obr. 2.2 (b) je zobrazen příklad prvního DCV měření na SBiDE. Pro techniku DPV i DCV platí, že pokud ponecháme SBiDE v pufru po dobu 5 s a více při potenciálu otevřeného obvodu nebo na vzduchu, dojde k oxidaci bismutu samotného a vzniklé oxidy jsou následně při prvním voltametrickém měření redukovány za vzniku signálů s velkou výškou.

Na obr. 2.3 (a) je znázorněno vyhodnocení DP voltamogramů analytu, na obr. 2.3 (b) je znázorněno vyhodnocení DC voltamogramů analytu. Po vyhodnocení voltamogramů byl získán potenciál píku E_p a proud píku I_p.

Všechny předkládané grafy v diplomové práci byly vytvořeny v programu Origin 2022 (Origin Lab Corporation, USA), který byl rovněž použit při statistickém zpracování získaných dat. Výpočty a statistická hodnocení dat byly realizovány také v programu MS Excel 2016 (Microsoft Corporation).



Obr. 2.1 (a) Určení počátku potenciálového okna roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9 na SBiDE technikou DPV. (b) Příklad prvního (1) a druhého (2) měření v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9 na SBiDE technikou DPV, měřeno při E_{in} = −450 mV.

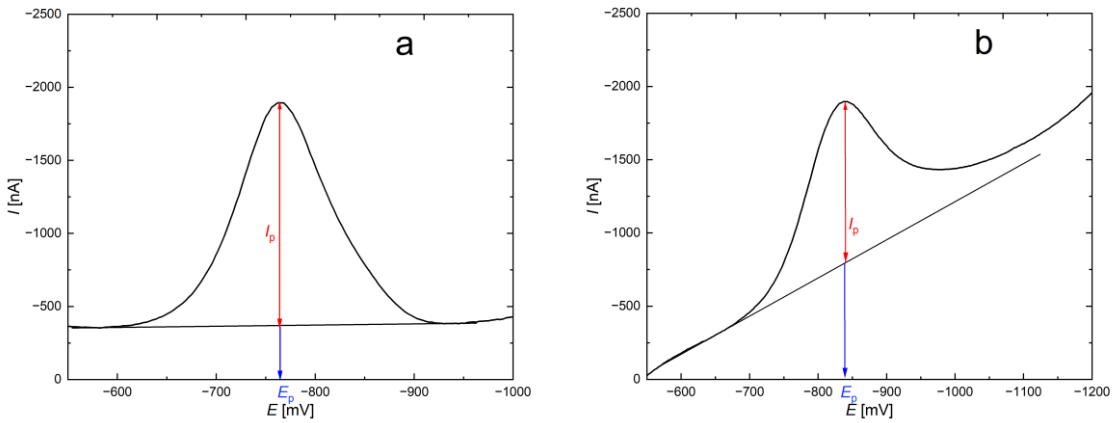


Obr. 2.2 (a) Určení počátku potenciálového okna roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9 na SBiDE technikou DCV. (b) Příklad prvního (1) a druhého (2) měření v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9 na SBiDE technikou DCV (1), měřeno při E_{in} = −500 mV.

Tabulka 2.1

Hodnoty šíře potenciálových oken při DPV a DCV stanovení nifedipinu (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}). E_{in} značí počáteční potenciál a E_{fin} značí koncový potenciál. Měřeno na SBiDE (vs. Ag/AgCl, 3mol l^{-1} KCl) v prostředí BR pufr–EtOH (9:1) při různých pH použitého BR pufru.

	DPV		DCV	
pH	E_{in} [mV]	E_{fin} [mV]	E_{in} [mV]	E_{fin} [mV]
2,0	−250	−1000	−370	−900
3,0	−290	−1050	−340	−1050
4,0	−320	−1050	−370	−1100
5,0	−350	−1200	−400	−1150
6,0	−380	−1200	−460	−1250
7,0	−400	−1250	−430	−1300
8,0	−420	−1300	−450	−1350
9,0	−450	−1350	−500	−1300
10,0	−480	−1400	−550	−1400
11,0	−510	−1450	−570	−1450
12,0	−540	−1450	−590	−1500



Obr. 2.3 (a) Ukázka způsobu vyhodnocení DP voltamogramu nifedipinu o koncentraci 1·10^{-4} mol l^{-1} v prostředí BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9. Proud píku je značen jako *I*p, potenciál píku je značen jako *E*p. (b) Ukázka způsobu vyhodnocení DC voltamogramu nifedipinu o koncentraci 1·10^{-4} mol l^{-1} v prostředí BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9. Proud píku je značen jako *I*p, potenciál píku je značen jako *E*p.

3. Výsledky a diskuse

3.1 Diferenční pulzní voltametrie

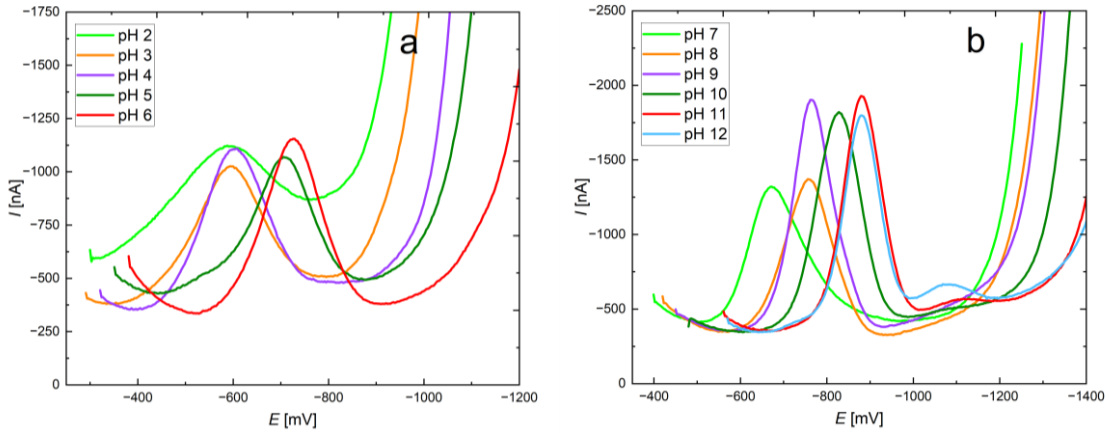
3.1.1 Vliv pH

Chování nifedipinu (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}) bylo zkoumáno technikou DPV v prostředí roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 v rozmezí pH 2 – 12. Nifedipin v tomto rozmezí pH poskytuje jeden dobře vyvinutý pík odpovídající čtyřelektronové ireverzibilní redukci nitroskupiny na odpovídající hydroxylamin[71]. Na obr 3.1 jsou znázorněny DP voltamogramy nifedipinu zaznamenané na SBiDE v roztocích BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o různém pH.

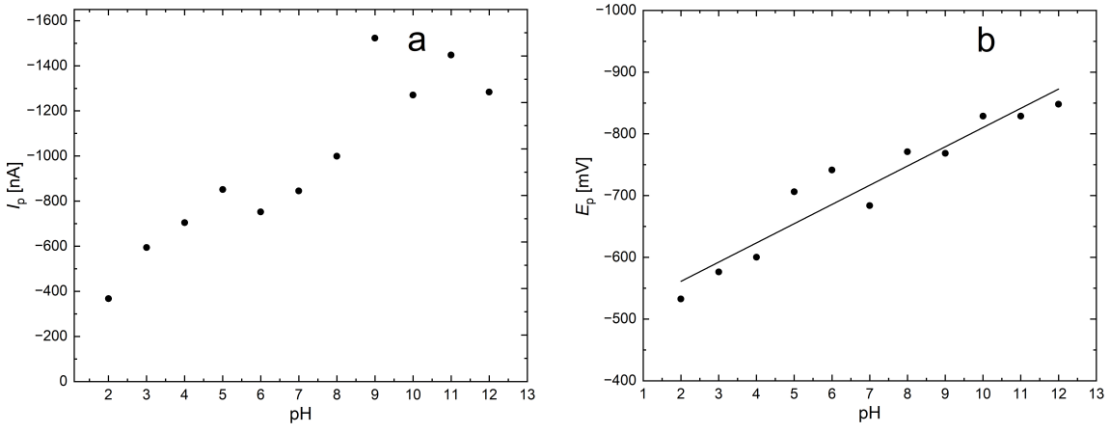
Výška píku nifedipinu v roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 v rozmezí pH 2 – 5 postupně stoupá. Poté u pH 6 dochází k poklesu signálu, ale zároveň v rozmezí pH 6 – 8 a pH 10 – 11 výška píku postupně stoupá. Za povšimnutí stojí výška píku nifedipinu v roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9, kdy dochází k nejvyššímu vzrůstu signálu, a také výška píku nifedipinu v roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 12, kde dochází k značnému poklesu signálu, a odpovídá tak výšce píku nifedipinu v roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 10. Na obr 3.2 (a) je vyznačena závislost výšky píku nifedipinu na měnícím se pH použitého BR pufru.

Na obr. 3.2 (b) je vyznačena závislosti potenciálu píku nifedipinu na různém pH. Při změně pH prostředí by se potenciál píku nifedipinu měl ideálně posouvat o 59 mV se změnou pH o jednotku. Se snižujícím se pH by se potenciály píku nifedipinu měly posouvat směrem k pozitivnějším hodnotám potenciálů a se zvyšujícím se pH by se potenciály píků měly posouvat směrem k negativnějším hodnotám potenciálů. Tento trend však u této elektrody ne vždy zcela platí. V oblasti pH 2 – 12 byla nalezena směrnice −31,2 [mV/pH]. Pokud tuto hodnotu vložíme do poměru m/n (kdy m značí počet protonů a n značí počet neutronů), získáme hodnotu 0,53. Tato hodnota ukazuje, že v této oblasti pH dochází při redukci nifedipinu k přenosu jednoho elektronu a 0,53 protonu (spíše tedy násobků čísla čtyři). Jelikož je u redukce nitroskupiny ve vodných prostředích známo, že při ní obecně dochází k výměně čtyř elektronů a čtyři H^+ iontů[71], jedná se u získané hodnoty směrnice spíše o potvrzení, že SBiDE nevykazuje zcela spolehlivou a opakovatelnou hodnotu elektrodového potenciálu při dlouhodobějším opakovaném používání. Odchylky od linearity jsou pravděpodobně také způsobené špatnou opakovatelností při měřeních v prostředích o různých pH.

Jako optimální prostředí byl vybrán roztok BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9, pro dobře vyvinutý pík a nejvyšší proudovou odezvu.



Obr. 3.1 DP voltamogramy nifedipinu (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE v roztocích BR pufr–EtOH (9:1) o různém pH, (a) rozmezí pH 2 – 6, (b) rozmezí pH 7 – 12.



Obr. 3.2 (a) Závislost proudové odezvy nifedipinu (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}) na různém pH roztoku BR pufr–EtOH (9:1), měřeno na SBiDE. (b) Závislost potenciálu píku nifedipinu (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}) na různém pH roztoku BR pufr–EtOH (9:1), měřeno na SBiDE.

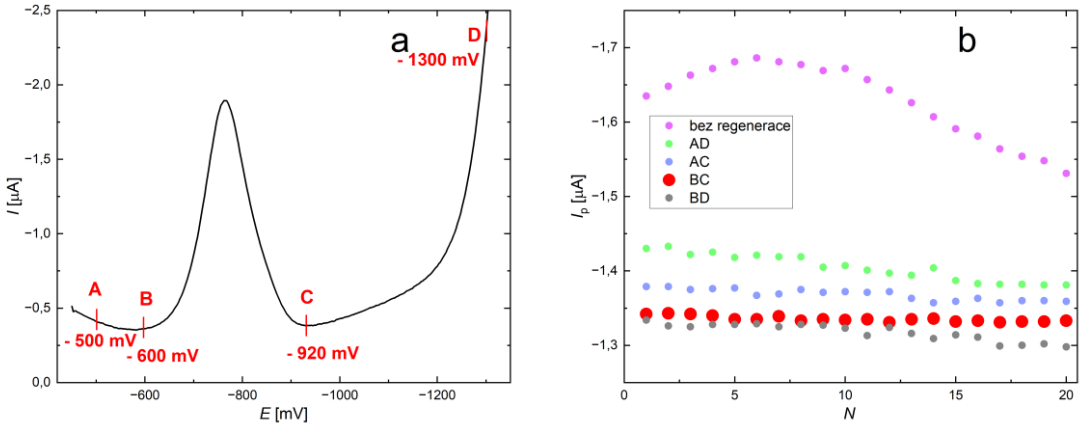
3.1.2 Vliv regenerace povrchu SBiDE

Bylo zkoumáno, zda je nutné zakomponovat elektrochemickou regeneraci povrchu pracovní elektrody při opakovaných DPV stanoveních nifedipinu na SBiDE. Vliv elektrochemické regenerace byl zkoumán za účelem zajištění dobré opakovatelnosti stanovení, a také aby pracovní elektroda nepodléhala pasivaci. Proudová odezva byla pozorována při 20 po sobě následujících stanoveních nifedipinu. Měření probíhalo v optimálním prostředí roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9 (viz kapitola 3.1.1). Bylo zkoumáno využití čtyř dvojic regeneračních potenciálů, které byly vkládány po dobu 30 s před každým měřením (každý z nich střídavě vždy po dobu 100 ms v celkem 150 cyklech).

První dvojice regeneračních potenciálů $E_{in_r} = -500$ mV a $E_{fin_r} = -1300$ mV byla zvolena na základě šířky stanoveného potenciálového okna (viz tabulka 2.1). Aby se předešlo nechtěné degradaci povrchu pracovní elektrody, byl E_{in_r} zvolen o 50 mV negativnější než E_{in} a E_{fin_r} byl zvolen o 50 mV pozitivnější než E_{fin}. Relativní směrodatná odchylka pro toto měření činila 1,21 %. Druhá dvojice regeneračních potenciálů $E_{in_r} = -500$ mV a $E_{fin_r} = -920$ mV byla stanovena tak, že E_{in_r} byl zvolen o 50 mV negativnější než E_{in} (kvůli nechtěné degradaci povrchu elektrody) a E_{fin_r} byl zvolen jako nejbližší hodnota potenciálu za píkem nifedipinu. Relativní směrodatná odchylka pro toto měření činila 0,55 %. Další dvojice regeneračních potenciálů $E_{in_r} = -600$ mV a $E_{fin_r} = -920$ mV byla zvolena jako nejbližší hodnoty potenciálů před píkem a za píkem nifedipinu. Relativní směrodatná odchylka pro toto měření činila 0,28 %. Poslední dvojice regeneračních potenciálů $E_{in_r} = -600$ mV a $E_{fin_r} = -1300$ mV byla stanovena tak, že E_{in_r} odpovídal nejbližší hodnotě potenciálu před píkem a E_{fin_r} byl zvolen o 50 mV pozitivnější než E_{fin} (kvůli nechtěné degradaci povrchu elektrody). Relativní směrodatná odchylka pro toto měření činila 0,85 %. Relativní směrodatná odchylka pro měření bez zakomponování elektrochemických regeneračních potenciálů činila 3,04 %. Na obr. 3.3 (a) je znázorněno sestavení elektrochemických regeneračních potenciálů. Na obr. 3.3 (b) jsou znázorněny velikosti proudů píku nifedipinu na počtu opakovaných stanovení bez zařazené elektrochemické regenerace a se zařazenou elektrochemickou regenerací.

Aplikované regenerační potenciály sice snížily proudovou odezvu nifedipinu, ale zlepšily opakovatelnost stanovení. Pro další měření technikou DPV byly vybrány elektrochemické regenerační potenciály $E_{in_r} = -600$ mV a $E_{fin_r} = -920$ mV pro nejlepší

opakovatelnost stanovení. Pro ustálení signálu bylo každé měření 10krát opakováno a posledních 5 naměřených křivek bylo vyhodnoceno a statisticky zpracováno.



Obr. 3.3 (a) Sestavení použitých dvojic elektrochemických regeneračních potenciálů. Ukázáno na DP voltamogramu nifedipinu (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}) na SBiDE v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9. (b) Závislost proudové odezvy nifedipinu (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}) na pořadovém čísle měření N (n = 20), měřeno na SBiDE v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9 technikou DPV. AD značí E_{in_r} = −500 mV a E_{fin_r} = −1300 mV, AC značí E_{in_r} = −500 mV a E_{fin_r} = −920 mV, BC značí E_{in_r} = −600 mV a E_{fin_r} = −920 mV, BD značí E_{in_r} = −600 mV a E_{fin_r} = −1300 mV.

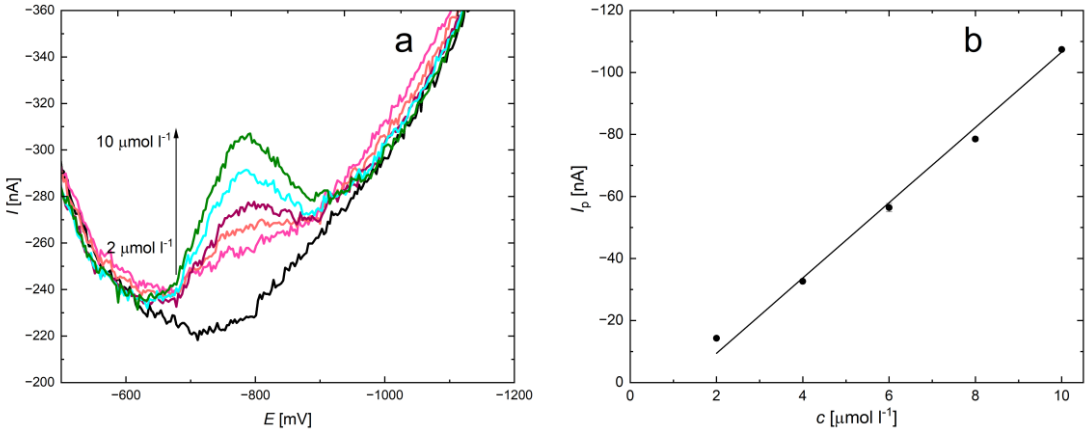
3.1.3 Kalibrační závislost

Kalibrační závislosti nifedipinu byly měřeny technikou DPV v koncentračním rozsahu 1 – 100 μmol l^{-1} v optimálním prostředí BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9 (viz kapitola 3.1.1) za použití elektrochemických regeneračních potenciálů E_{in_r} = −600 mV a E_{fin_r} = −920 mV (viz kapitola 3.1.2).

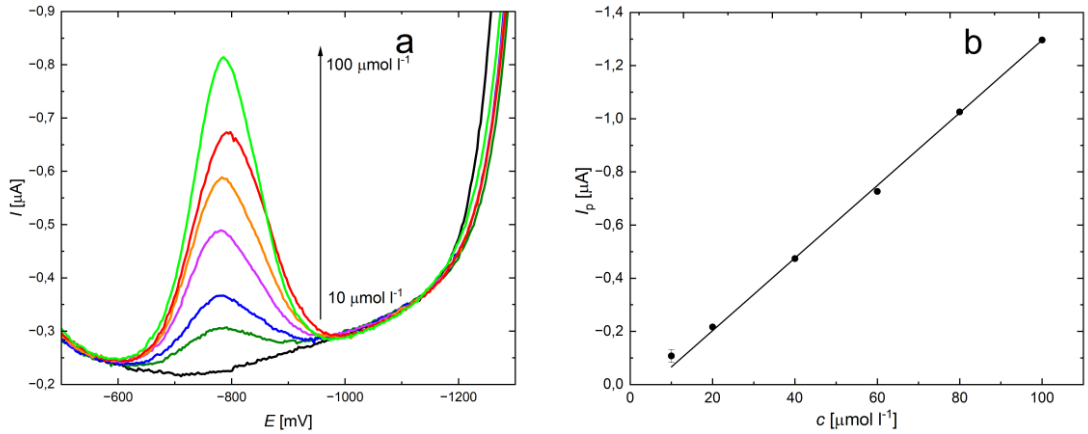
Na obr. 3.4 (a) jsou znázorněny voltamogramy nifedipinu o koncentraci 2 – 10 μmol l^{-1}, na obr 3.5 (a) jsou znázorněny voltamogramy nifedipinu o koncentraci 10 – 100 μmol l^{-1} a na obr 3.6 (a) jsou znázorněny voltamogramy nifedipinu o koncentraci 2 – 100 μmol l^{-1}.

Kalibrační závislosti výšky píku na koncentraci nifedipinu jsou znázorněny na obr. 3.4 (b) pro nifedipin o koncentraci 2 – 10 μmol l^{-1}, na obr 3.5 (b) pro nifedipin o koncentraci 10 – 100 μmol l^{-1} a na obr 3.6 (b) pro nifedipin o koncentraci 2 – 100 μmol l^{-1}. Nejnižší vyhodnotitelná koncentrace nifedipinu v optimálním prostředí roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9 činila 2 μmol l^{-1}. Z grafu vyplývá, že získaná závislost je lineární v koncentračním rozsahu nifedipinu 2 – 100 μmol l^{-1}.

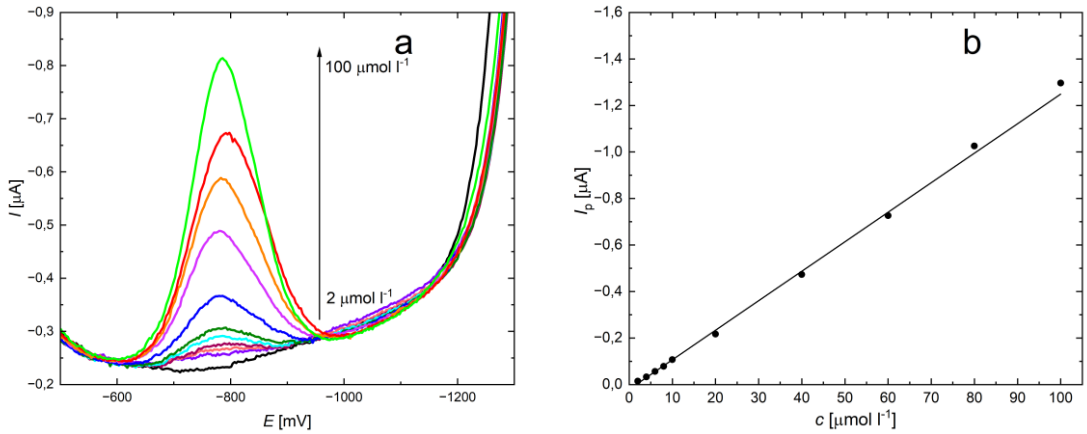
V tabulce 3.1 jsou uvedeny jednotlivé parametry kalibračních přímek. Mez stanovitelnosti (*LOQ*) byla vypočtena jako koncentrace odpovídající desetinásobku směrodatné odchylky (10σ; pro počet měření n = 5) proudové odezvy studované látky o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky. Mez detekce (*LOD*) byla vypočtena jako koncentrace odpovídající trojnásobku směrodatné odchylky (3σ; pro počet měření n = 5) proudové odezvy studované látky o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky[72]. Hodnoty *LOQ* a *LOD* jsou nižší, než nejnižší vyhodnotitelná koncentrace, a to z důvodu vysokého šumu, kvůli kterému nebylo možné nižší koncentrace spolehlivě vyhodnotit.



Obr. 3.4 (a) DP voltamogramy nifedipinu (c = 2 – 10 µmol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci nifedipinu (c = 2 – 10 µmol l^{-1}); chybové úsečky pro n = 5; rovnice regrese: I_p [µA] = −0,0116c [µmol l^{-1}] + 0,0118; r^2 = 0,9944.



Obr. 3.5 (a) DP voltamogramy nifedipinu (c = 10 – 100 µmol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE ve roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci nifedipinu (c = 10 – 100 µmol l^{-1}); chybové úsečky pro n = 5; rovnice regrese: I_p [µA] = −0,0133c [µmol l^{-1}] + 0,0462; r^2 = 0,9987.



Obr. 3.6 (a) DP voltamogramy nifedipinu (c = 2 – 100 µmol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci nifedipinu (c = 2 – 100 µmol l^{-1}); chybové úsečky pro n = 5; rovnice regrese: I_p [µA] = −0,0130c [µmol l^{-1}] + 0,0278; r^2 = 0,9988.

Tabulka 3.1

Parametry kalibračních přímek nifedipinu získané technikou DPV v prostředí roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9, měřeno na SBiDE.

c [µmol l^{-1}]	Směrnice [A l mol^{-1}]	Úsek [µA]	r^2	*LOQ* [µmol l^{-1}]	*LOD* [µmol l^{-1}]
2 – 10	−0,0116	0,0188	0,9944	0,47	0,14
10 – 100	−0,0133	0,0462	0,9987		
2 – 100	−0,0130	0,0278	0,9988		

3.2 DC voltametrie

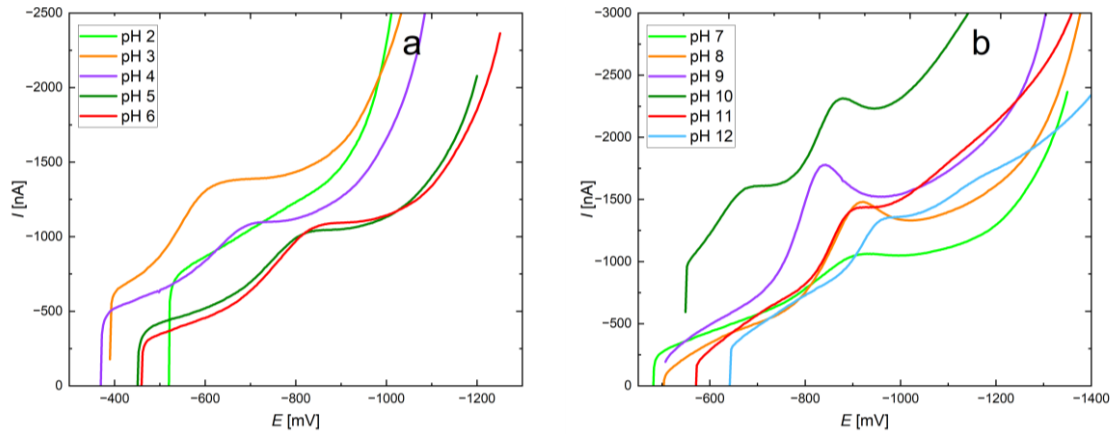
3.2.1 Vliv pH

Nejprve bylo zkoumáno chování nifedipinu (c = $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) technikou DCV v prostředí roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 v rozmezí pH 2 – 12. Nifedipin v rozmezí pH 3 – 12 poskytuje jeden dobře vyvinutý pík odpovídající čtyřelektronové ireverzibilní redukci nitroskupiny na odpovídající hydroxylamin[71]. Na obr 3.7 jsou znázorněny DC voltamogramy nifedipinu zaznamenané na SBiDE v roztocích BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o různým pH.

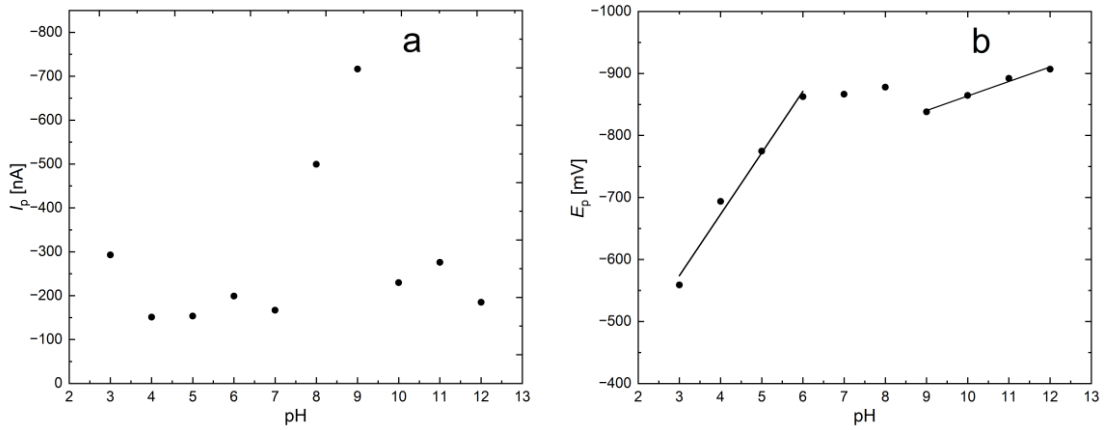
Proudová odezva píku v roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 v rozmezí pH 3 – 7 a 10 – 12 se pohybuje kolem 210 ± 60 nA a v prostředí o pH 8 se výška píku nifedipinu rovná 500 nA. Za povšimnutí stojí výška píku nifedipinu v roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9, kdy dochází k nejvyššímu vzrůstu signálu. Na obr 3.8 (a) je vyznačena závislost výšky píku nifedipinu na měnícím se pH použitého BR pufru.

Na obr 3.8 (b) je vyznačena závislosti potenciálu píku nifedipinu na různém pH. Potenciály píku nifedipinu se v roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 v rozmezí BR pufr–EtOH v poměru 9:1 pH 3 – 5 posouvají o 100 mV směrem k negativnějším hodnotám potenciálů. Následně se potenciály píku nifedipinu v roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 v rozmezí pH 6 – 8 pohybují okolo 870 ± 10 mV. Poté v prostředí o pH 9 dochází k posunutí potenciálu píku nifedipinu směrem k pozitivnějším hodnotám potenciálů a zároveň se potenciály píku nifedipinu v roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 v rozmezí pH 9 – 12 posouvají o 20 mV směrem k negativnějším hodnotám potenciálů. Při změně pH prostředí by se potenciál píku nifedipinu měl ideálně posouvat o 59 mV při změně pH o jednotku. Tento trend však u této elektrody ne vždy zcela platí. V oblasti pH 3 – 6 byla nalezena směrnice −99,1 [mV/pH]. Pokud tuto hodnotu vložíme do poměru m/n (kdy m značí počet protonů a n značí počet neutronů), získáme hodnotu 1,68. Tato hodnota ukazuje, že v této oblasti pH dochází při redukci nifedipinu k přenosu jednoho elektronu a téměř dvou protonů (spíše tedy násobků čísla čtyři). V oblasti pH 9 – 12 byla nalezena směrnice −23,4 [mV/pH]. Vložením této hodnoty do poměru získáme hodnotu 0,40. Tato hodnota ukazuje, že v této oblasti pH dochází při redukci nifedipinu k přenosu jednoho elektronu a méně než jednoho protonu (resp. násobků čísla čtyři). I zde se tedy potvrzuje, že SBiDE nevykazuje zcela spolehlivou a opakovatelnou hodnotu elektrodového potenciálu při jejím dlouhodobějším opakovaném používání.

Jako optimální prostředí byl vybrán roztok BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9, pro dobře vyvinutý pík a nejvyšší proudovou odezvu.



Obr. 3.7 DC voltamogramy nifedipinu ($c = 1{\cdot}10^{-4}$ mol l^{-1}) měřené na SBiDE v roztocích BR pufr–EtOH (9:1) o různém pH, (a) rozmezí pH 2 – 6, (b) rozmezí pH 7 – 12.



Obr. 3.8 (a) Závislost proudové odezvy nifedipinu ($c = 1{\cdot}10^{-4}$ mol l^{-1}) na různém pH roztoku BR pufr–EtOH (9:1), měřeno na SBiDE. (b) Závislost potenciálu píku nifedipinu ($c = 1{\cdot}10^{-4}$ mol l^{-1}) na různém pH roztoku BR pufr–EtOH (9:1). Zaznamenáno na SBiDE.

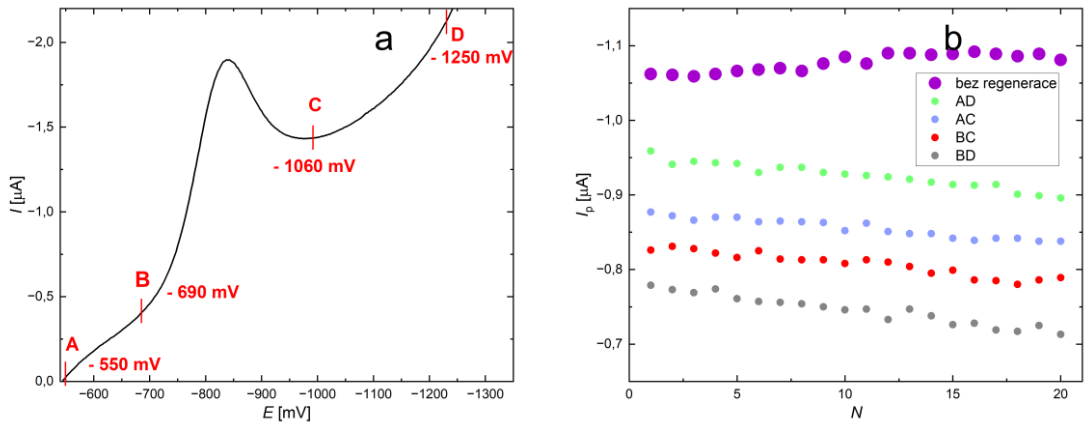
3.2.2 Vliv regenerace povrchu SBiDE

Dalším krokem bylo zjistit, zda je nutné zakomponovat elektrochemickou regeneraci povrchu pracovní elektrody při opakovaných DPV stanoveních nifedipinu na SBiDE. Proudová odezva byla pozorována při 20 po sobě následujících stanoveních nifedipinu. Měření probíhalo v optimálním prostředí roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9 (viz kapitola 3.1.1). K pozorování byly sestaveny čtyři dvojice regeneračních potenciálů, které byly vkládány po dobu 30 s před každým měřením (každý z nich střídavě vždy po dobu 100 ms v celkem 150 cyklech).

První dvojice regeneračních potenciálů $E_{in_r} = -550$ mV a $E_{fin_r} = -1250$ mV byla sestavena na základě stanovené šířky potenciálového okna (viz tabulka 2.1). E_{in_r} byl zvolen o 50 mV negativnější než E_{in} a E_{fin_r} byl zvolen o 50 mV pozitivnější než E_{fin} (aby nedocházelo k nechtěné degradaci povrchu pracovní elektrody). Relativní směrodatná odchylka pro toto měření činila 1,76 %. Druhá dvojice regeneračních potenciálů $E_{in_r} = -550$ mV a $E_{fin_r} = -1060$ mV byla sestavena tak, že E_{in_r} byl zvolen o 50 mV negativnější než E_{in} (kvůli nechtěné degradaci povrchu pracovní elektrody) a E_{fin_r} byl zvolen jako nejbližší hodnota potenciálu za píkem nifedipinu. Relativní směrodatná odchylka pro toto měření činila 1,47 %. Třetí dvojice regeneračních potenciálů $E_{in_r} = -690$ mV a $E_{fin_r} = -1060$ mV byla zvolena jako dvě nejbližší hodnoty potenciálů před píkem a za píkem nifedipinu. Relativní směrodatná odchylka pro toto měření činila 1,92 %. Poslední dvojice regeneračních potenciálů $E_{in_r} = -550$ mV a $E_{fin_r} = -1250$ mV byla sestavena tak, že E_{in_r} je hodnota nejbližšího potenciálu před píkem nifedipinu a E_{fin_r} byl zvolen o 50 mV pozitivnější než E_{fin} (kvůli nechtěné degradaci povrchu pracovní elektrody). Relativní směrodatná odchylka pro toto měření činila 2,63 %. Relativní směrodatná odchylka pro měření bez zakomponování elektrochemických regeneračních potenciálů činila 1,07 %. Na obr. 3.9 (a) je ukázáno sestavení použitých elektrochemických regeneračních potenciálů. Na obr. 3.9 (b) jsou znázorněny velikosti proudů píku nifedipinu na počtu opakovaných stanovení bez zařazené elektrochemické regenerace a se zařazenou elektrochemickou regenerací.

Aplikované regenerační potenciály snížily proudovou odezvu nifedipinu a zhoršily opakovatelnost stanovení. Pro další měření technikou DCV nebyly použity žádné elektrochemické regenerační potenciály. Pro ustálení signálu bylo každé měření 10krát

opakováno a posledních 5 naměřených křivek bylo vyhodnoceno a statisticky zpracováno.



Obr. 3.9 (a) Sestavení použitých dvojic elektrochemických regeneračních potenciálů. Ukázáno na DC voltamogramu nifedipinu (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}) na SBiDE v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9. (b) Závislost proudové odezvy nifedipinu (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}) na pořadovém čísle měření N (n = 20), měřeno na SBiDE v roztoku BR pufr–EtOH v (9:1) o pH 9 technikou DCV. AD značí E_{in_r} = −550 mV a E_{fin_r} = −1250 mV, AC značí E_{in_r} = −550 mV a E_{fin_r} = −1060 mV, BC značí E_{in_r} = −690 mV a E_{fin_r} = −1060 mV, BD značí E_{in_r} = −690 mV a E_{fin_r} = −1250 mV.

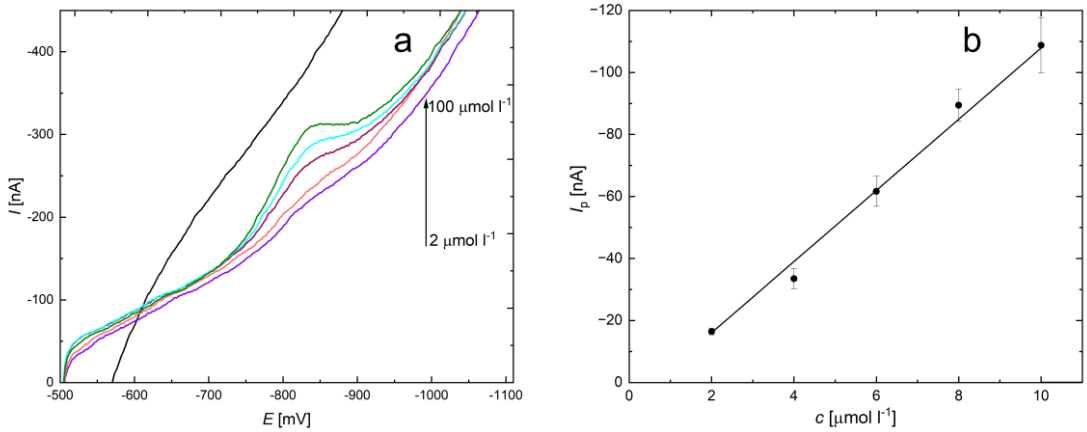
3.2.3 Kalibrační závislost

Kalibrační závislosti nifedipinu byly měřeny technikou DCV v koncentračním rozsahu 1 – 100 μmol l^{-1} v optimálním prostředí BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9 (viz kapitola 3.1.1).

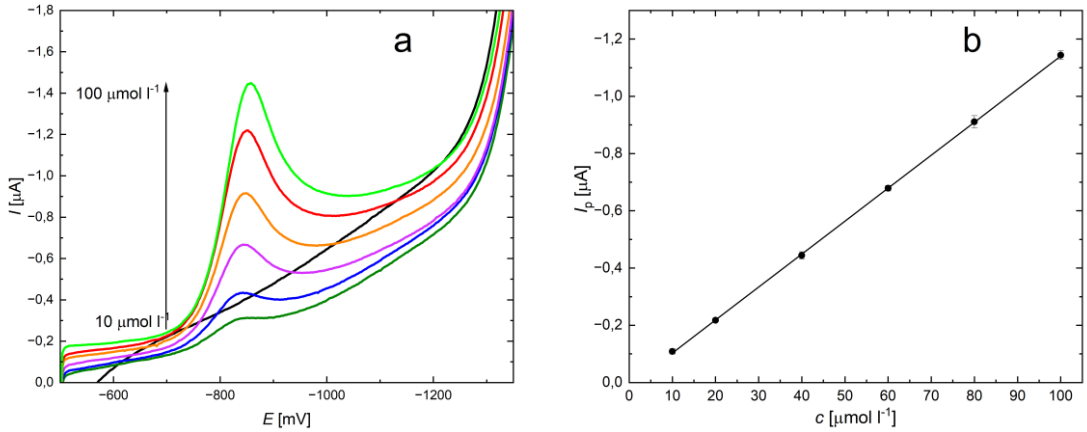
Na obr. 3.10 (a) jsou znázorněny voltamogramy nifedipinu o koncentraci 2 – 10 μmol l^{-1}, na obr 3.11 (a) jsou znázorněny voltamogramy nifedipinu o koncentraci 10 – 100 μmol l^{-1}, na obr 3.12 (a) jsou znázorněny voltamogramy nifedipinu o koncentraci 2 – 100 μmol l^{-1}.

Kalibrační závislosti výšky píku na koncentraci nifedipinu jsou znázorněny na obr. 3.10 (b) pro nifedipin o koncentraci 2 – 10 μmol l^{-1}, na obr 3.11 (b) pro nifedipin o koncentraci 10 – 100 μmol l^{-1} a na obr 3.12 (b) pro nifedipin o koncentraci 2 – 100 μmol l^{-1}. Nejnižší vyhodnotitelná koncentrace nifedipinu v optimálním prostředí roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9 činila 2 μmol l^{-1}. Z grafu vyplývá, že získaná závislost je lineární v koncentračním rozsahu nifedipinu 2 – 100 μmol l^{-1}.

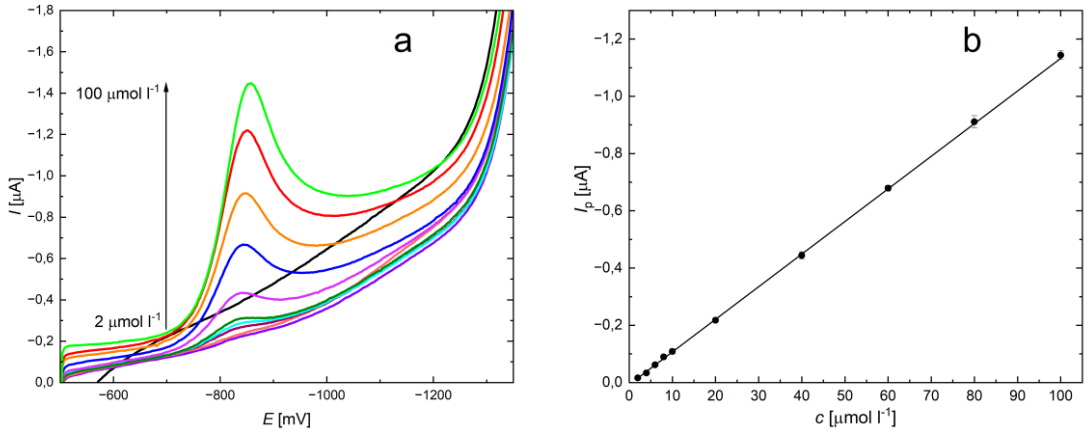
V tabulce 3.2 jsou uvedeny jednotlivé parametry kalibračních přímek. Mez stanovitelnosti (*LOQ*) byla vypočtena jako koncentrace odpovídající desetinásobku směrodatné odchylky (10σ; pro počet měření $n = 5$) proudové odezvy studované látky o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky. Mez detekce (*LOD*) byla vypočtena jako koncentrace odpovídající trojnásobku směrodatné odchylky (3σ; pro počet měření $n = 5$) proudové odezvy studované látky o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky[72]. Hodnoty *LOQ* a *LOD* jsou nižší, než nejnižší vyhodnotitelná koncentrace, a to z důvodu vysokého šumu, kvůli kterému nebylo možné nižší koncentrace spolehlivě vyhodnotit.



Obr. 3.10 (a) DP voltamogramy nifedipinu (c = 2 – 10 µmol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci nifedipinu (c = 2 – 10 µmol l^{-1}); chybové úsečky pro n = 5; rovnice regrese: I_p [µA] = −0,0120c [µmol l^{-1}] + 0,0102; r^2 = 0,9932.



Obr. 3.11 (a) DP voltamogramy nifedipinu (c = 10 – 100 µmol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci nifedipinu (c = 10 – 100 µmol l^{-1}); chybové úsečky pro n = 5; rovnice regrese: I_p [µA] = −0,0115c [µmol l^{-1}] + 0,0117; r^2 = 0,9987.



Obr. 3.12 (a) DP voltamogramy nifedipinu (c = 2 – 100 µmol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci nifedipinu (c = 2 – 100 µmol l^{-1}); chybové úsečky pro n = 5; rovnice regrese: I_p [µA] = −0,0115c [µmol l^{-1}] + 0,0278; r^2 = 0,9988.

Tabulka 3.2

Parametry kalibračních přímek nifedipinu získané technikou DPV v prostředí roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9, zaznamenáno na SBiDE.

c [µmol l^{-1}]	Směrnice [A l mol^{-1}]	Úsek [µA]	r^2	*LOQ* [µmol l^{-1}]	*LOD* [µmol l^{-1}]
2 – 10	−0,0120	0,0102	0,9932	1,1	0,33
10 – 100	−0,0115	0,0117	0,9999		
2 – 100	−0,0115	0,0086	0,9999		

3.3 Voltametrické stanovení nifedipinu v lékové formě

Voltametrické stanovení množství nifedipinu v léčivu bylo prováděno metodami DPV a DCV pomocí metody přídavku standardu za dříve získaných optimálních podmínek v lékové formě Cordipin XL.

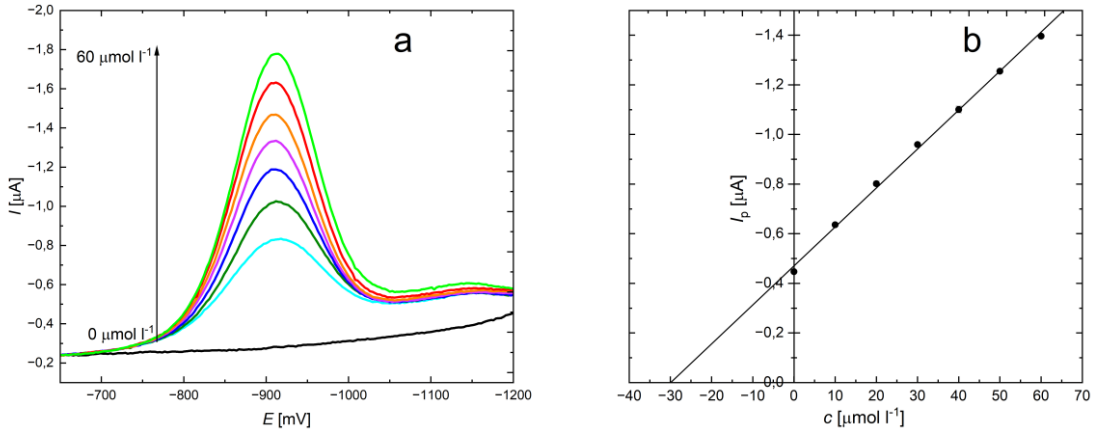
Tableta Cordipin XL byla zvážena a rozetřena v třecí misce ($m_{\text{Cordipin XL}}$ = 0,1581 g). Zásobní roztok lékové formy Cordipin XL o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1} byl připraven kvantitativním převedením 13,69 mg tablety do 10ml odměrné baňky, která byla doplněna ethanolem po rysku. Protože se v tabletě vyskytuje velké množství pomocných látek, které ovlivňovaly průběh měření, musel být připravený zásobní roztok přefiltrován přes filtrační nástavec na injekční stříkačku (Schleicher & Schuell, FP 030/2; 0,45 μm).

Pro měření metodami DPV a DCV byly připraveny 10ml roztoky BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9, které obsahovaly vždy 400 μl přefiltrovaného zásobního roztoku léčiva Cordipin XL o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}. První roztok byl změřen bez přídavku zásobního roztoku standardu analytu ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}). Ostatní roztoky byly změřeny se 100μl přídavkem standardu, jehož objem se v následujícím vzorku zvýšil vždy o 100 μl. Vzorky byly kvantitativně převedeny do voltametrické nádobky a probublány dusíkem po dobu 3 minut. Pro ustálení signálu bylo každé stanovení 10krát opakováno a posledních 5 naměřených křivek bylo vyhodnoceno.

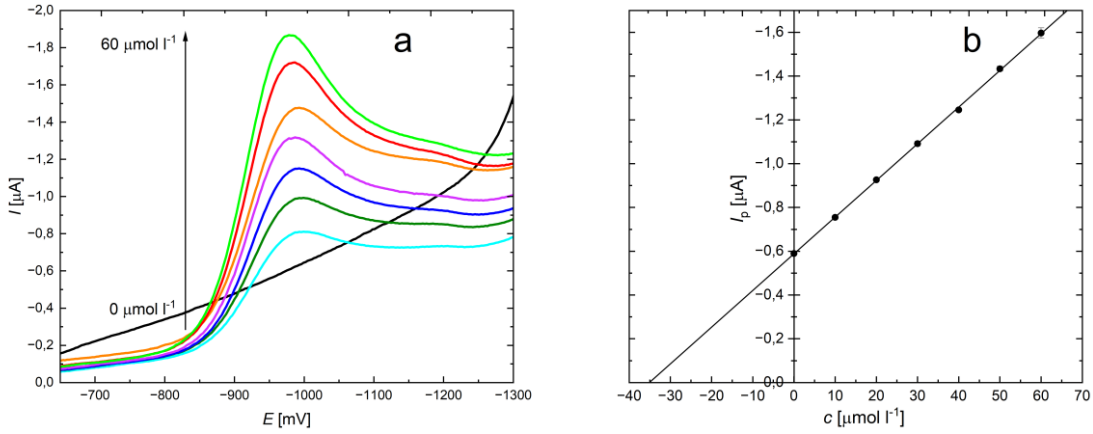
Stanovení nifedipinu v lékové formě Cordipin XL probíhalo v koncentračním rozmezí přidaného standardu 10 – 60 μmol l^{-1}.

Na obr. 3.13 (a) jsou znázorněny DP voltamogramy nifedipinu v lékové formě Cordipin XL, na obr. 3.13 (b) je znázorněna závislost výšky píku na koncentraci přidaného standardu nifedipinu. Na obr. 3.14 (a) jsou znázorněny DC voltamogramy nifedipinu v lékové formě Cordipin XL, na obr. 3.14 (b) je znázorněna závislost výšky píku na koncentraci přidaného standardu nifedipinu. V tabulce 3.3 jsou uvedeny parametry lineárních koncentračních závislostí přidaného standardu nifedipinu v lékové formě Cordipin XL. V tabulce 3.4 jsou uvedeny hodnoty spočteného množství nifedipinu v lékové formě Cordipin XL. Po vyhodnocení a srovnání výsledků (viz tabulka 3.7) je zřejmé, že voltametrické stanovení nifedipinu v lékové formě Cordipin XL je do značné míry spolehlivé. Metodou DPV jsme získali obsah 78,8 % nifedipinu (uváděné jako hodnoty výtěžnosti v procentech) a metodou DCV jsme získali obsah 87,6 %. Výsledek metody DCV je téměř shodný se získaným výsledkem spektrofotometrie (viz kapitola 3.4), tedy

obsah 90,0 %. Nižší výtěžnost u DPV mohla být způsobena větší citlivostí této techniky na přítomné interferující látky.



Obr. 3.13 (a) DP voltamogramy nifedipinu ve vzorcích tvořených podílem lékové formy Cordipin XL a přidaným standardem analytu (c = 0 – 60 µmol l^{-1}). Měřeno na SBiDE metodou přídavku standardu v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Závislost výšky píku na koncentraci přidaného standardu nifedipinu v tabletě Cordipin XL (c = 0 – 60 µmol l^{-1}); chybové úsečky pro n = 5.



Obr. 3.14 (a) DC voltamogramy nifedipinu ve vzorcích tvořených podílem lékové formy Cordipin XL a přidaným standardem analytu (c = 0 – 60 µmol l^{-1}). Měřeno na SBiDE metodou přídavku standardu v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Závislost výšky píku na koncentraci přidaného standardu nifedipinu v tabletě Cordipin XL (c = 0 – 60 µmol l^{-1}); chybové úsečky pro n = 5.

Tabulka 3.3

Parametry lineárních koncentračních závislostí pro přidaný standard nifedipinu v lékové formě Cordipin XL získané pomocí metod DPV a DCV v prostředí roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9. Zaznamenáno na SBiDE.

Tableta Cordipin XL	$c_{\text{standard nifedipin}}$ [µmol l^{-1}]	Směrnice [mA l mol^{-1}]	Úsek [nA]	r^2
DPV	0 – 60	−15,2	−480	0,9945
DCV	0 – 60	−16,8	−588	0,9997

Tabulka 3.4

Spočtené množství nifedipinu v lékové formě Cordipin XL vztahující se k deklarovanému množství nifedipinu na obalu přípravku. Měřeno pomocí metod DPV a DCV v prostředí roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9. Zaznamenáno na SBiDE.

Tableta Cordipin XL	$c_{\text{standard nifedipin}}$ [μmol l^{-1}]	$m_{\text{deklarovaná}}$ [mg]	$m_{\text{vypočtená}}$ [mg]	w [%]
DPV	0 – 60	40	31,6	78,8
DCV	0 – 60	40	35,2	87,6

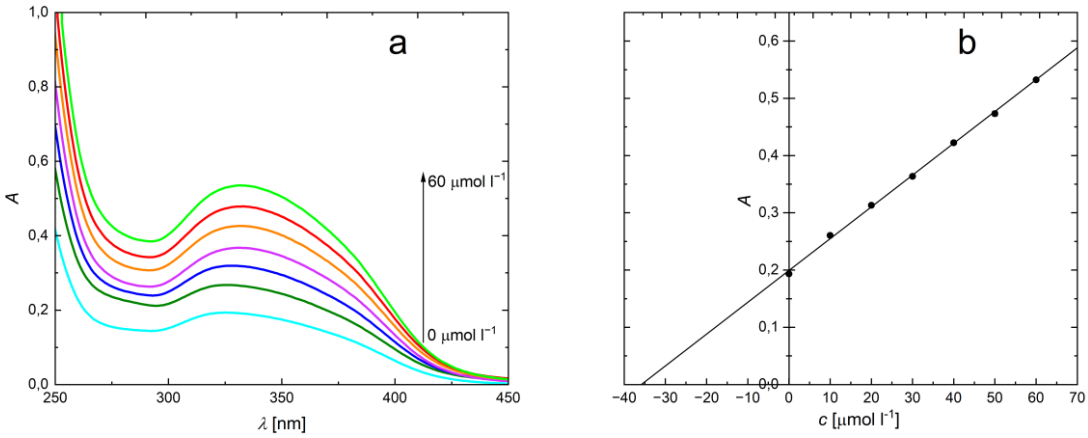
3.4 Spektrofotometrické stanovení nifedipinu v lékové formě

UV-VIS absorpční spektrofotometrie byla použita jako analytická srovnávací metoda k voltametrickému stanovení množství nifedipinu v lékové formě Cordipin XL. Měření probíhalo metodou přídavku standardu za dříve získaných optimálních podmínek.

Pro měření metodou přídavku standardu UV-VIS absorpční spektrofotometrií byly připraveny 10ml vzorky roztoku BR pufr−EtOH v poměru 9:1 o pH 9, které obsahovaly vždy 400 µl přefiltrovaného zásobního roztoku léčiva Cordipin XL o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1} (viz kapitola 3.3). První roztok byl změřen bez přídavku zásobního roztoku standardu nifedipinu ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}). K dalšímu roztoku bylo přidáno 100 µl zásobního roztoku standardu analytu ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}). Objem přidaného roztoku standardu se v následujícím vzorku zvýšil vždy o 100 µl.

Roztoky byly proměřovány v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm v rozsahu vlnových délek 200 − 1100 nm na přístroji Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA) proti roztoku BR pufr−EtOH v poměru 9:1 o pH 9. Křivky absorpčních spekter byly 3krát změřeny a poté vyhodnoceny.

Stanovení nifedipinu v lékové formě Cordipin XL probíhalo v koncentračním rozmezí přidaného standardu 10 – 60 µmol l^{-1}. Na obr. 3.15 (a) jsou znázorněny absorpční spektra nifedipinu v tabletě Cordipin XL. Na obr. 3.15 (b) je znázorněna závislost absorbance na koncentraci přidaného standardu nifedipinu v tabletě Cordipin XL. V tabulce 3.5 jsou uvedeny parametry lineárních koncentračních závislostí přidaného standardu nifedipinu v lékové formě Cordipin XL. V tabulce 3.6 jsou uvedeny hodnoty spočteného množství nifedipinu v lékové formě Cordipin XL. V tabulce 3.7 je zobrazeno porovnání voltametrického a spektrofotometrického stanoveného množství nifedipinu v lékové formě Cordipin XL.



Obr. 3.15 (a) Absorpční spektra nifedipinu ve vzorcích tvořených podílem lékové formy Cordipin XL a přidaným standardem analytu (c = 0 – 60 µmol l^{-1}). Měřeno metodou přídavku standardu v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9 v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm v rozsahu vlnových délek 200 – 1100 nm. (b) Závislost absorbance na koncentraci přidaného standardu nifedipinu v tabletě Cordipin XL (c = 0 – 60 µmol l^{-1}); chybové úsečky pro n = 5.

Tabulka 3.5

Parametry lineárních koncentračních závislostí pro přidaný standard nifedipinu v lékové formě Cordipin XL získané pomocí metody UV-VIS absorpční spektrofotometrie v prostředí roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9. Zaznamenáno v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm v rozsahu vlnových délek 200 – 1100 nm.

Léčivo	$c_{\text{standard nifedipin}}$ [µmol l^{-1}]	Směrnice [l µmol^{-1}]	Úsek	r^2
Tableta Cordipin XL	0 – 60	$5{,}54 \cdot 10^{-3}$	0,199	0,9989

Tabulka 3.6

Spočtené množství nifedipinu v lékové formě Cordipin XL vztahující se k deklarovanému množství nifedipinu na obalu přípravku. Měřeno pomocí metody UV-VIS absorpční spektrofotometrie v prostředí roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9. Zaznamenáno v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm v rozsahu vlnových délek 200 – 1100 nm.

Léčivo	$c_{\text{standard nifedipin}}$ [µmol l^{-1}]	$m_{\text{deklarovaná}}$ [mg]	$m_{\text{vypočtená}}$ [mg]	w [%]
Tableta Cordipin XL	0 – 60	40	36	90

Tabulka 3.7

Hodnoty spočteného množství nifedipinu v lékové formě Cordipin XL vztahující se k deklarovanému množství nifedipinu na obalu přípravku. Získáno pomocí nově vyvinutých elektrochemických metod (w_{DPV}, w_{DCV}) a srovnávací analytické metodě ($w_{\text{spektrometrie}}$). Poměr uvedených hodnot w_{DPV}, w_{DCV} / $w_{\text{spektrometrie}}$ představuje skutečnou výtěžnost metod DPV a DCV na SBiDE v porovnání s analytickou srovnávací metodou.

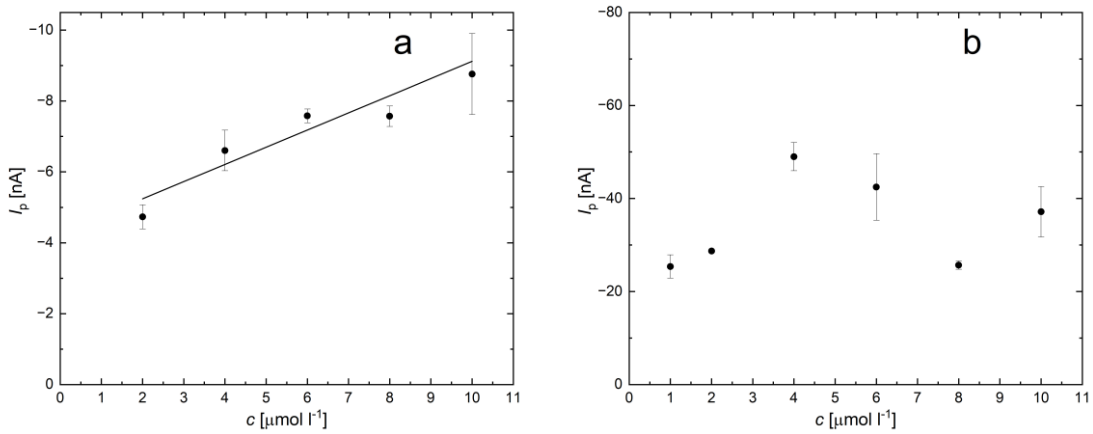
Léčivo	w_{DPV} [%]	w_{DCV} [%]	$w_{\text{spektrometrie}}$ [%]	w_{DPV} / $w_{\text{spektrometrie}}$ [%]	w_{DCV} / $w_{\text{spektrometrie}}$ [%]
Tableta Cordipin XL	78,8	87,6	90,0	87,6	97,3

3.5 Stanovení nifedipinu v autentických vzorcích pitné a říční vody

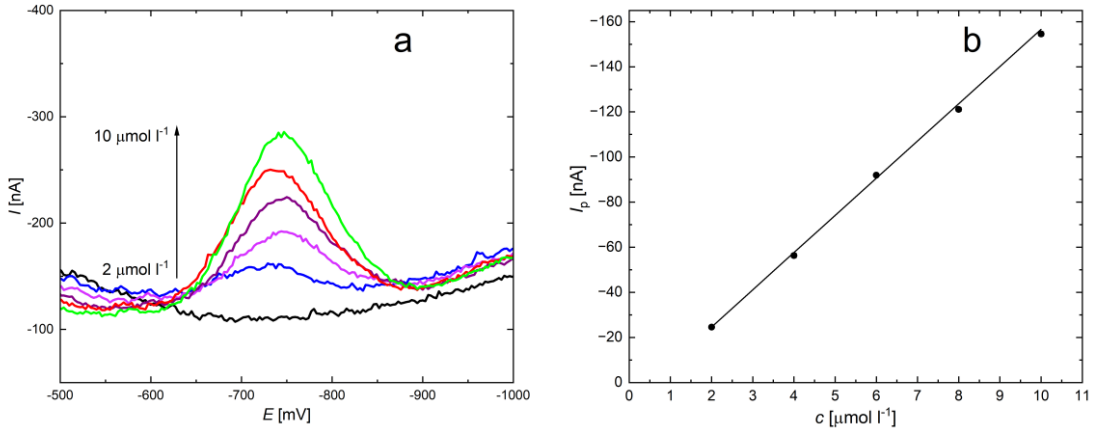
Chování nifedipinu bylo zkoumáno nově vyvinutými metodami DCV a DPV za dříve získaných optimálních podmínek v autentických vzorcích pitné a říční vody. Pitná voda byla odebrána z vodovodní sítě v budově Chemického ústavu Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Říční voda byla odebrána u sportovního areálu Hamr v říčce Botič. Autentické vzorky o celkovém objemu 10 ml byly tvořeny 9 ml pitné či říční vody, příslušným množstvím standardu nifedipinu ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}) a 1 ml BR pufru o pH 9.

Na obr. 3.16 (a) je znázorněna závislost výšky píku na koncentraci nifedipinu; měřeno metodou DPV v autentickém vzorku pitné vody. Na obr. 3.16 (b) je znázorněna závislost výšky píku na koncentraci nifedipinu; měřeno metodou DCV v autentickém vzorku pitné vody. Z grafů je vidět, že signál byl několikanásobně potlačen vlivem interferujících iontů a povrchově aktivních látek, které jsou přítomny v pitné vodě. U metody DCV navíc ani nebylo možné zkonstruovat rostoucí kalibrační závislost. Pro vyvázání iontů kovů tvořících komplexy bylo nutné ke vzorkům přidat 100 µl 0,1mol l^{-1} chelatonu III. Na obr. 3.17 (a) jsou znázorněny DP voltamogramy nifedipinu v autentickém vzorku pitné vody s přídavkem chelatonu III. Na obr 3.17 (b) je znázorněna závislost výšky DPV píku na koncentraci nifedipinu v autentickém vzorku pitné vody s přídavkem chelatonu III. Na obr 3.18 (a) jsou znázorněny DC voltamogramy nifedipinu v autentickém vzorku pitné vody s přídavkem chelatonu III. Na obr. 3.18 (b) je znázorněna závislost výšky DCV píku na koncentraci nifedipinu v autentickém vzorku pitné vody s přídavkem chelatonu III. Kalibrační závislosti byly měřeny v rozsahu koncentrací 1 – 10 µmol l^{-1}. Nejnižší vyhodnotitelná koncentrace nifedipinu ve vzorcích pitné vody u obou metod činila 2 µmol l^{-1}. Parametry kalibračních přímek metod DPV a DCV jsou uvedeny v tabulce 3.8. Ze získaných nižších hodnot směrnice je zřejmé, že pitná voda snižuje citlivost stanovení. Tento fakt může ještě podpořit naředění vzorků základním elektrolytem.

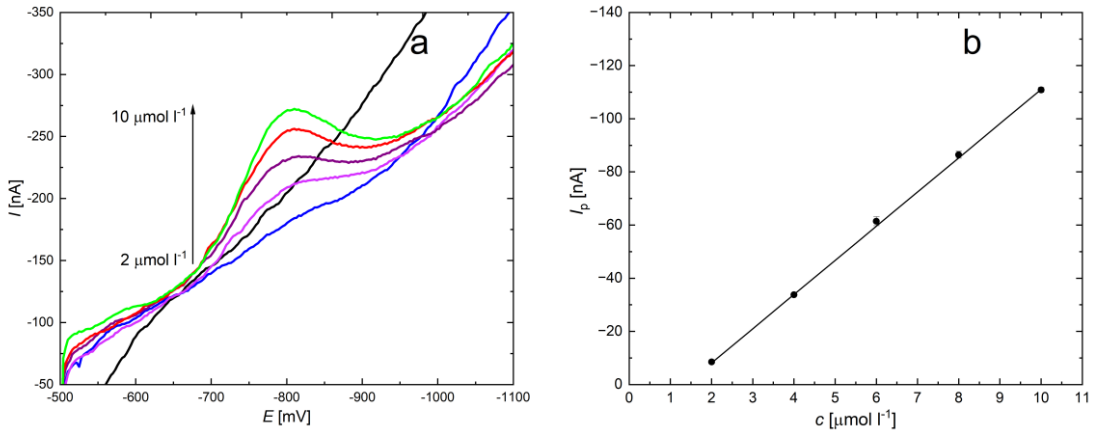
Na obr. 3.19 jsou znázorněny vybrané DP voltamogramy nifedipinu v autentických vzorcích říční vody s přídavkem chelatonu III. Kalibrační závislosti byly měřeny v rozsahu koncentrací 1 – 10 µmol l^{-1}. Z grafu, na kterém nelze pozorovat žádné vyhodnotitelné voltametrické píky, je patrné, že říční voda obsahuje látky, které buď interagují se stanovovanou látkou, nebo se během měření adsorbují na povrch elektrody.



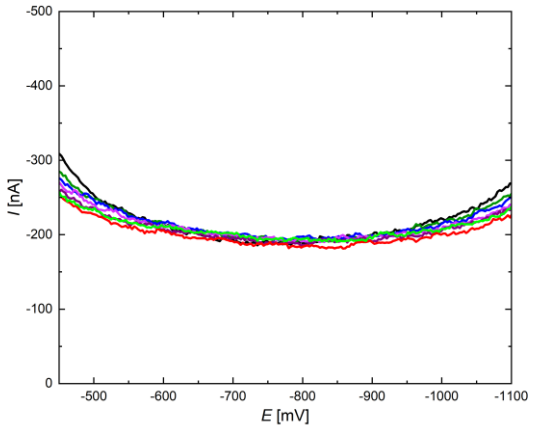
Obr. 3.16 (a) Závislost výšky DPV píku na koncentraci nifedipinu (c = 2 – 10 μmol l^{-1}) v autentických vzorcích pitné vody bez přítomnosti chelatonu III. Základní elektrolyt obsahoval 9 ml autentického vzorku pitné vody a 1 ml BR pufru o pH 9. Chybové úsečky pro n = 5. (b) Závislost výšky DCV píku na koncentraci nifedipinu (c = 1 – 10 μmol l^{-1}) v autentických vzorcích pitné vody bez přítomnosti chelatonu III. Základní elektrolyt obsahoval 9 ml autentického vzorku pitné vody a 1 ml BR pufru o pH 9. Chybové úsečky pro n = 5.



Obr. 3.17 (a) DP voltamogramy nifedipinu (c = 2 – 10 μmol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE v autentických vzorcích pitné vody s přídavkem 100 μl 0,1mol l^{-1} chelatonu III. Černá barva značí základní elektrolyt, který obsahoval 9 ml autentického vzorku pitné vody a 1 ml BR pufru o pH 9. (b) Závislost výšky píku na koncentraci nifedipinu (c = 2 – 10 μmol l^{-1}). Chybové úsečky pro n = 5.



Obr. 3.18 (a) DC voltamogramy nifedipinu (c = 2 – 10 µmol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE v autentických vzorcích pitné vody s přídavkem 100 µl 0,1mol l^{-1} chelatonu III. Černá barva značí základní elektrolyt, který obsahoval 9 ml autentického vzorku pitné vody a 1 ml BR pufru o pH 9. (b) Závislost výšky píku na koncentraci nifedipinu (c = 2 – 10 µmol l^{-1}). Chybové úsečky pro n = 5.



Obr. 3.19 DP voltamogramy nifedipinu (c = 1 – 10 µmol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE v autentických vzorcích říční vody s přídavkem 100 µl 0,1mol l^{-1} chelatonu III. Černá barva značí základní elektrolyt, který obsahoval 9 ml autentického vzorku říční vody a 1 ml BR pufru o pH 9.

Tabulka 3.8

Parametry lineárních koncentračních závislostí nifedipinu (c = 1 – 10 µmol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE v autentických vzorcích pitné vody s přídavkem 100 µl 0,1mol l^{-1} chelatonu III a bez přídavku chelatonu III. Základní elektrolyt obsahoval 9 ml autentického vzorku pitné/říční vody a 1 ml BR pufru o pH 9.

		c [µmol l^{-1}]	Směrnice [mA l mol^{-1}]	Úsek [nA]	r^2
DPV	bez EDTA	2 – 10	−0,451	−4,34	0,8998
	EDTA	2 – 10	−16,2	7,71	0,9993
DCV	bez EDTA	1 – 10	–	–	–
	EDTA	2 – 10	−12,9	17,0	0,9995

3.6 Cyklická voltametrie

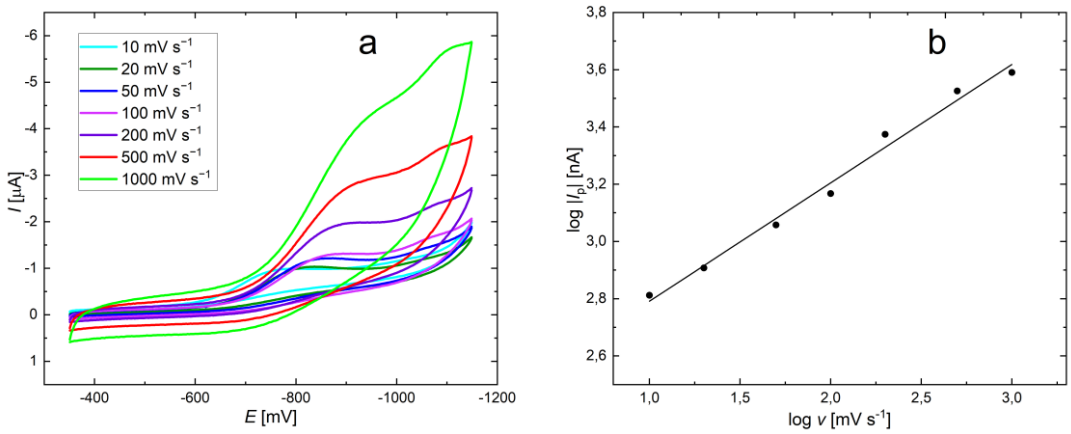
Elektrochemické chování nifedipinu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) bylo zkoumáno také pomocí cyklické voltametrie v prostředí BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 3, 5, 7, 9 a 11. Při těchto pH byly proměřeny cyklické voltamogramy s rychlostí polarizace 10, 20, 50, 100, 200, 500 a 1000 mV s^{-1}. Cyklickou voltametrií dokážeme blíže prozkoumat elektrochemické přeměny nifedipinu a řídící děje.

Nitroskupina studované látky se redukuje za přijmutí čtyř elektronů na odpovídající hydroxylamin. V kyselém, neutrálním a slabě alkalickém prostředí dochází k redukci na hydroxylamin v jednom kroku, přičemž v kyselém prostředí bývá možné pozorovat i pík následné redukce hydroxylaminu na odpovídající amin prostřednictvím výměny dvou elektronů a dvou vodíkových iontů. V silně alkalickém prostředí dojde nejprve k přeměně pomocí jednoho elektronu na anion nitroradikál a následně zbylé tři elektrony se podílí na přeměně na hydroxylamin. Cyklické voltamogramy nifedipinu při různých rychlostech polarizace jsou zobrazeny na obr. 3.20 (a) pro BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 3 (je možné pozorovat dva výše zmiňované voltametrické píky popisované pro silně kyselá prostředí), na obr. 3.21 (a) pro BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 5, na obr. 3.22 (a) pro BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 7, na obr. 3.23 (a) pro BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9 a na obr. 3.24 (a) pro BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 11 (je možné pozorovat dva výše zmiňované voltametrické píky popisované pro silně zásaditá prostředí).

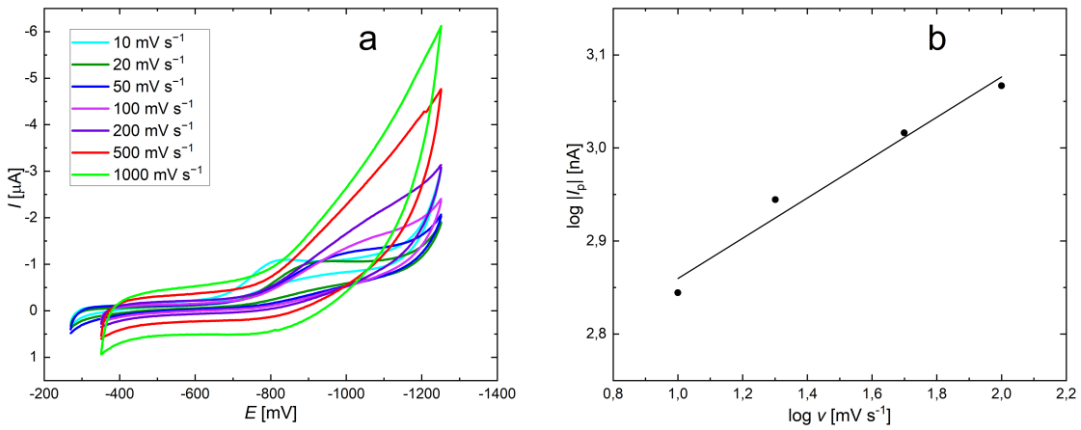
Pro všechny zobrazené cyklické voltamogramy platí, že s rostoucí rychlostí polarizace dochází ke zvýšení proudové odezvy. Při nižších rychlostech polarizace má elektrochemický systém více času na dosažení rovnováhy elektrodové reakce. Se zvyšující se rychlostí polarizace dochází u pH 3 a 7 k deformaci (potlačení píku) nifedipinu a u pH 5 dochází ke ztrátě píku nifedipinu (proto bylo možné vyhodnotit pouze cyklické voltamogramy naměřené při nižších rychlostech polarizace). Důvodem je pomalá elektrodová reakce, která při vysoké rychlosti nestačí proběhnout (kinetické omezení). U pH 3, 5 a 7 se při všech rychlostech polarizace jedná o ireverzibilní děje. U pH 9 nedochází při vyšších rychlostech polarizace k deformaci píku nifedipinu. Při nižších rychlostech polarizace se jedná o ireverzibilní děj a se zvyšující se rychlostí polarizace dochází k přechodu na kvazireverzibilní děj. U pH 11 také nedochází se zvyšující se rychlostí polarizace k deformaci píku nifedipinu a lze zde vidět náznak druhého píku. Při nižších rychlostech

polarizace se jedná o ireverzibilní děj a se zvyšující se rychlostí polarizace dochází k přechodu na kvazireverzibilní děj.

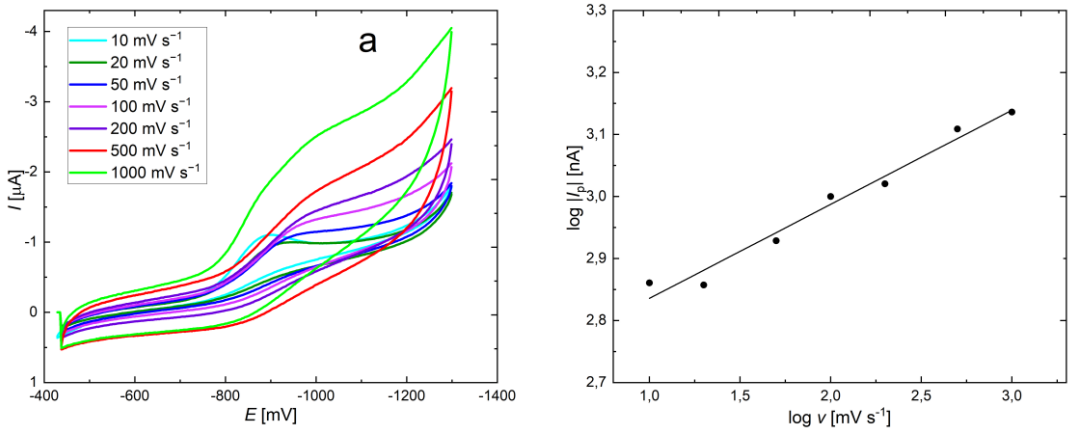
Cyklické voltamogramy byly vyhodnoceny a do grafu byly vyneseny závislosti dekadického logaritmu proudu píku ($\log |I_p|$) na dekadickém logaritmu rychlosti polarizace ($\log v$). Následně, podle absolutní hodnoty jejich směrnice (k), bylo možné určit, jakým krokem byly elektrodové děje na SBiDE kontrolovány. Pokud se $|k| = 0{,}5$, pak je elektrodový děj řízen difuzí analytu, pokud je $|k| = 1$, pak je elektrodový děj kontrolován adsorpcí analytu na povrch elektrody, a pokud platí $0 < |k| < 0{,}5$, pak je nejpomalejším krokem elektrodového děje elektrodová reakce vykazující nízkou rychlost (elektrodový děj řízen kinetikou elektrodové reakce)[73]. V prostředích o pH 5 a 7 byl elektrodový děj ovlivněn čistě kinetikou (nízkou rychlostí). V prostředích o pH 3, 9 a 11 byl elektrodový děj ovlivněn převážně difuzí analytu. Závislost logaritmu výšky píku na logaritmu rychlosti polarizace jsou zobrazeny na na obr. 3.20 (b) pro BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 3, na obr. 3.21 (b) pro BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 5, na obr. 3.22 (b) pro BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 7, na obr. 3.23 (b) pro BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9 a na obr. 3.24 (b) pro BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 11.



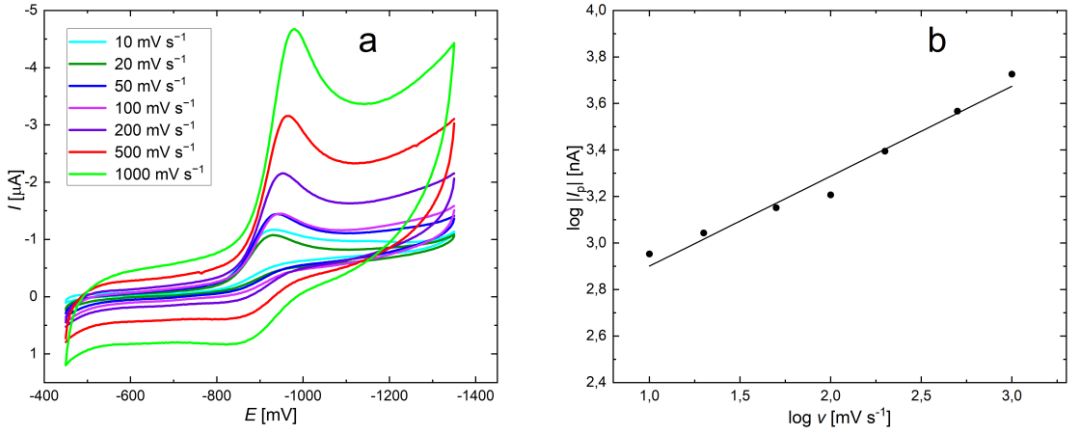
Obr. 3.20 (a) Cyklické voltamogramy nifedipinu ($c = 1{\cdot}10^{-4}$ mol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE při rychlostech polarizace (v) 10, 20, 50, 100, 200, 500 a 1000 mV s^{-1} v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 3. (b) Závislost log $|I_p|$ nifedipinu ($c = 1{\cdot}10^{-4}$ mol l^{-1}) na log v. Změřeno pomocí cyklické voltametrie v rozmezí rychlostí polarizace 10 – 1000 mV s^{-1} v prostředí BR pufr–EtOH (9:1) o pH 3. Rovnice regrese: $y = 0{,}413x + 2{,}38$; $r^2 = 0{,}9886$.



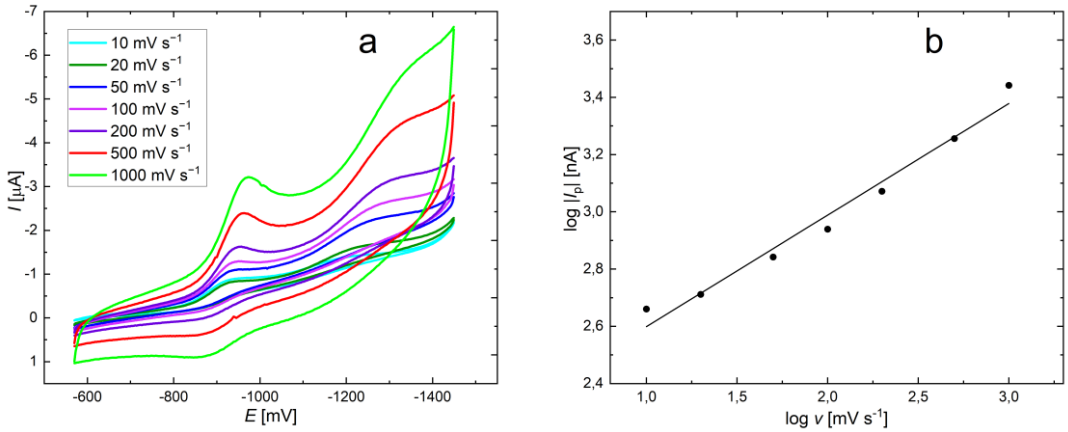
Obr. 3.21 (a) Cyklické voltamogramy nifedipinu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE při rychlostech polarizace (v) 10, 20, 50, 100, 200, 500 a 1000 mV s^{-1} v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 5. (b) Závislost log $|I_p|$ nifedipinu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) na log v. Změřeno pomocí cyklické voltametrie v rozmezí rychlostí polarizace 10 – 1000 mV s^{-1} v prostředí BR pufr–EtOH (9:1) o pH 5. Rovnice regrese: $y = 0{,}217x + 2{,}64$; $r^2 = 0{,}9739$.



Obr. 3.22 (a) Cyklické voltamogramy nifedipinu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE při rychlostech polarizace (v) 10, 20, 50, 100, 200, 500 a 1000 mV s^{-1} v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 7. (b) Závislost log $|I_p|$ nifedipinu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) na log v. Změřeno pomocí cyklické voltametrie v rozmezí rychlostí polarizace 10 – 1000 mV s^{-1} v prostředí BR pufr–EtOH (9:1) o pH 7. Rovnice regrese: $y = 0{,}152x + 2{,}68$; $r^2 = 0{,}9740$.



Obr. 3.23 (a) Cyklické voltamogramy nifedipinu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE při rychlostech polarizace (v) 10, 20, 50, 100, 200, 500 a 1000 mV s^{-1} v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9. (b) Závislost log $|I_p|$ nifedipinu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) na log v. Změřeno pomocí cyklické voltametrie v rozmezí rychlostí polarizace 10 – 1000 mV s^{-1} v prostředí BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9. Rovnice regrese: $y = 0{,}384x + 2{,}52$; $r^2 = 0{,}9727$.



Obr. 3.24 (a) Cyklické voltamogramy nifedipinu (c = $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE při rychlostech polarizace (v) 10, 20, 50, 100, 200, 500 a 1000 mV s^{-1} v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 11. (b) Závislost log $|I_p|$ nifedipinu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) na log v. Změřeno pomocí cyklické voltametrie v rozmezí rychlostí polarizace 10 – 1000 mV s^{-1} v prostředí BR pufr–EtOH (9:1) o pH 11. Rovnice regrese: $y = 0{,}390x + 2{,}21$; $r^2 = 0{,}9752$.

3.7 Adsorpční rozpouštěcí voltametrie

Technikou diferenční pulzní adsorpční rozpouštěcí voltametrie (DPAdSV) bylo zkoumáno možné nahromadění nifedipinu na povrch elektrody před samotnou analýzou pro získání vyšší proudové odezvy v prostředí BR pufru o pH 5, 7, 9 a 11. Pro měření byly připraveny 10 ml vzorky obsahující roztok BR pufru o určitém pH a příslušné množství zásobního roztoku nifedipinu (c = 1·10^{-3} mol l^{-1}). Měření bylo prováděno nejprve s přídavkem ethanolu (jehož celkový objem v roztoku byl roven 1 ml) a bez přídavku ethanolu. Vzorky byly kvantitativně převedeny do voltametrické nádobky a probublány dusíkem po dobu 3 minut. Míchání roztoku probíhalo pouze během fáze akumulace, ale během samotného měření křivek k míchání nedocházelo.

Prvním krokem u DPAdSV bylo nalezení optimálního akumulačního potenciálu, času akumulace a prostředí, ve kterém bylo měření prováděno. U každého zkoumaného pH s přídavkem ethanolu byly stanoveny podle jeho počátku potenciálového okna tři akumulační potenciály. První akumulační potenciál odpovídal hodnotě potenciálu před píkem nifedipinu (E_{akum1_EtOH}), druhý (E_{akum2_EtOH}) byl o 50 mV pozitivnější a třetí (E_{akum3_EtOH}) byl o 100 mV pozitivnější než E_{akum1_EtOH}. Vliv akumulačních potenciálů byl zkoumán při akumulačním čase (t_{akum}) 60, 120 a 180 s. Hodnoty akumulačních potenciálů v prostředí o pH 5 činily E_{akum1_EtOH} = −650 mV, E_{akum2_EtOH} = −600 mV a E_{akum3_EtOH} = −550 mV, v prostředí o pH 7 činily E_{akum1_EtOH} = −700 mV, E_{akum2_EtOH} = −650 mV a E_{akum3_EtOH} = −600 mV, v prostředí o pH 9 činily E_{akum1_EtOH} = −600 mV, E_{akum2_EtOH} = −550 mV a E_{akum3_EtOH} = −500 mV a v prostředí o pH 11 činily E_{akum1_EtOH} = −800 mV, E_{akum2_EtOH} = −750 mV a E_{akum3_EtOH} = −700 mV.

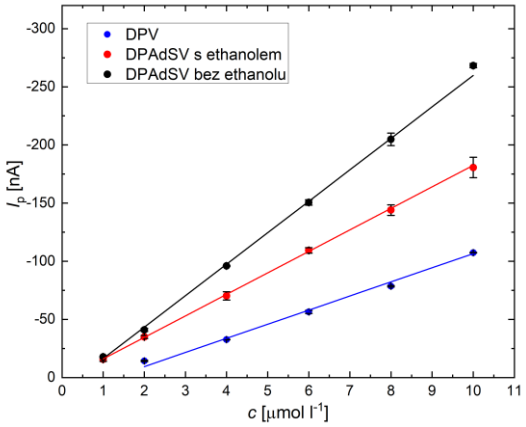
Nejprve byla změřena výška signálu bez zakomponované akumulace. Ta byla následně porovnána s naměřenou výškou signálu se zakomponovanými akumulačními potenciály a časy. V prostředí o pH 5 a 7 docházelo s každým vloženým akumulačním potenciálem k poklesu signálu, proto bylo měření prováděno pouze při 60 s akumulačního času. V prostředí o pH 9 zůstal signál s každým vloženým akumulačním potenciálem stejně vysoký, proto bylo měření prováděno také pouze při 60 s akumulačního času. Z těchto důvodů nebyla prostředí o pH 5, 7 a 9 vyhovující pro DPAdSV na SBiDE. V prostředí o pH 11 došlo s použitím prvního akumulačního potenciálu (E_{akum1_EtOH} = −800 mV) při t_{akum} = 60 s k značnému zvýšení signálu. Proto měření s E_{akum1_EtOH} = −800 mV bylo opakováno s akumulačním časem 120 s a 180 s, ale

výška signálu se téměř nezměnila. Při vložení zbylých dvou akumulačních potenciálů při 60 s též nedošlo ke změně proudové odezvy.

Jako optimální prostředí pro DPAdSV s přídavkem ethanolu (DPAdSV–EtOH) byl vybrán roztok BR pufru o pH 11 s akumulačními potenciály E_{akum_EtOH} = −800 mV a akumulačním časem t_{akum_EtOH} = 60 s. Následně byl stejným způsobem v prostředí o pH 11 bez přídavku ethanolu (DPAdSV) stanoven akumulační potenciál E_{akum} = −700 mV a akumulační čas t_{akum} = 60 s.

Druhým krokem bylo za získaných optimálních podmínek naměřit kalibrační závislosti v koncentračním rozsahu nifedipinu 1 – 10 μmol l^{-1} (viz obr. 3.25). Z grafu je patrné, že pomocí metody DPAdSV s přídavkem i bez přídavku ethanolu došlo k značnému zvýšení proudové odezvy nifedipinu oproti proudové odezvě získané metodou DPV. *LOQ* u kalibračních závislostí získaných metodou DPV a DPAdSV–EtOH jsou téměř shodné. Důvodem je nejspíše velmi dobrá opakovatelnost stanovení nejnižších vyhodnotitelných koncentrací analytu, ze kterých se hodnota *LOQ* počítá, u metody DPV. Díky DPAdSV i DPAdSV–EtOH došlo k zvýšení citlivosti a nejnižší vyhodnotitelná koncentrace nifedipinu tak činila 1 μmol l^{-1}. Při měření metodou DPAdSV–EtOH, byla získána nižší proudová odezva nifedipinu než u měření bez ethanolu. Přídavek ethanolu způsobil potlačení signálu. Nejlepší výsledky měření tedy byly získány pomocí DPAdSV. Parametry naměřených kalibračních závislostí jsou ukázány v tabulce 3.9. Dle této tabulky by se na základě *LOQ* dalo naměřit nejméně ¾ nižšího koncentračního řádu, ale kvůli vysokému šumu by nebylo možné signály spolehlivě vyhodnotit.

Chování nifedipinu bylo zkoumáno metodou DPAdSV také v autentickém vzorku pitné vody. Měření probíhalo v prostředí BR pufru o pH 11 bez přídavku ethanolu, za přítomnosti chelatonu III (viz kapitola 3.5), s akumulačním potenciálem E_{akum} = −800 mV a akumulačním časem t_{akum} = 60 s. Avšak bylo zjištěno, že přidané akumulační potenciály měly negativní vliv na měření a i s navyšující se koncentrací přidaného nifedipinu zůstal signál neměnný (data nejsou ukázána).



Obr. 3.25 Porovnání závislostí výšky píku na koncentraci nifedipinu (c = 1 – 10 µmol l^{-1}) zaznamenaných na SBiDE v roztoku BR pufru o pH 11 metodou DPV, DPAdSV a DPAdSV–EtOH. Metoda DPAdSV–EtOH byla měřena s E_{akum_EtOH} = −800 mV, t_{akum_EtOH} = 60 s (červená barva) a metoda DPAdSV byla měřena s E_{akum} = −700 mV, t_{akum} = 60 s (černá barva). Chybové úsečky pro n = 5.

Tabulka 3.9

Parametry kalibračních přímek nifedipinu pro metody DPV a DPAdSV v prostředí roztoku BR pufr o pH 11. Měřeno s přídavkem ethanolu s akumulačním potenciálem E_{akum_EtOH} = −800 mV a akumulačním časem t_{akum_EtOH} = 60 s a bez přídavku ethanolu s akumulačním potenciálem E_{akum} = −700 mV a akumulačním časem t_{akum} = 60 s. Zaznamenáno na SBiDE.

	Směrnice [A l mol^{-1}]	Úsek [µA]	r^2	*LOQ* [µmol l^{-1}]	*LOD* [µmol l^{-1}]
DPV	−0,0116	0,0118	0,9944	0,47	0,14
DPAdSV–EtOH	−0,0183	0,0022	0,9998	0,80	0,24
DPAdSV	−0,0277	0,0136	0,9989	0,52	0,16

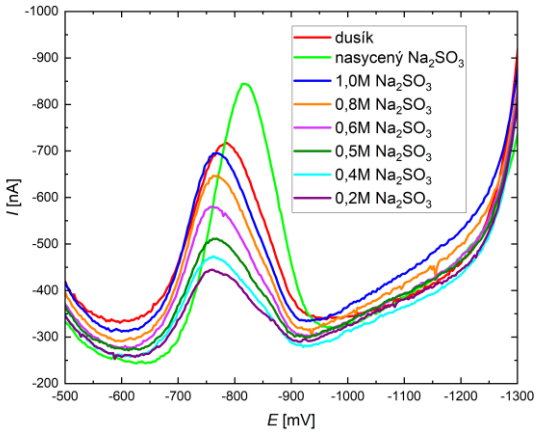
3.8 Odstranění kyslíku pomocí nasyceného roztoku siřičitanu sodného

Roztok siřičitanu sodného (Na_2SO_3) byl v této diplomové práci přidáván k analyzovanému vzorku jako redukční činidlo pro odstranění kyslíku, aby byla vyzkoušena možnost provádění analýz bez nutnosti probublávání vzorků inertním plynem, což je výhodné především při analýzách mimo vybavenou laboratoř, např. v terénu.

Chování nifedipinu bylo zkoumáno za dříve získaných optimálních podmínek metodami DPV a DCV. Před začátkem měření bylo nejprve nutné zjistit správnou koncentraci Na_2SO_3, abychom získali co nejlépe vyvinutý a vyhodnotitelný pík. Roztoky Na_2SO_3 byly připraveny v koncentračním rozmezí 0,2 – 1,0 mol l^{-1} spolu s nasyceným roztokem. Ke každému připravenému roztoku bylo těsně před měřením přidáno vždy 100 µl roztoku Na_2SO_3. Odstranění nežádoucího kyslíku pomocí roztoku siřičitanu sodného bylo úspěšné pouze u metody DPV. Při měření metodou DCV nedocházelo k ustálení signálu, přičemž proudová odezva píku nifedipinu se neustále měnila.

Na obr. 3.26 jsou znázorněny DP voltamogramy nifedipinu (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}) při přídavku 100 µl siřičitanu sodného o různých koncentracích. Z grafu je patrné, že se snižující se koncentrací Na_2SO_3 dochází ke snížení proudové odezvy nifedipinu. Pro další měření byl proto vybrán nasycený roztok siřičitanu sodného.

Nasycený roztok Na_2SO_3 byl aplikován za použití metody DPV při měření kalibračních závislostí, stanovení množství nifedipinu v lékové formě Cordipin XL, při stanovení nifedipinu v autentickém vzorku pitné vody a při DPAdSV.



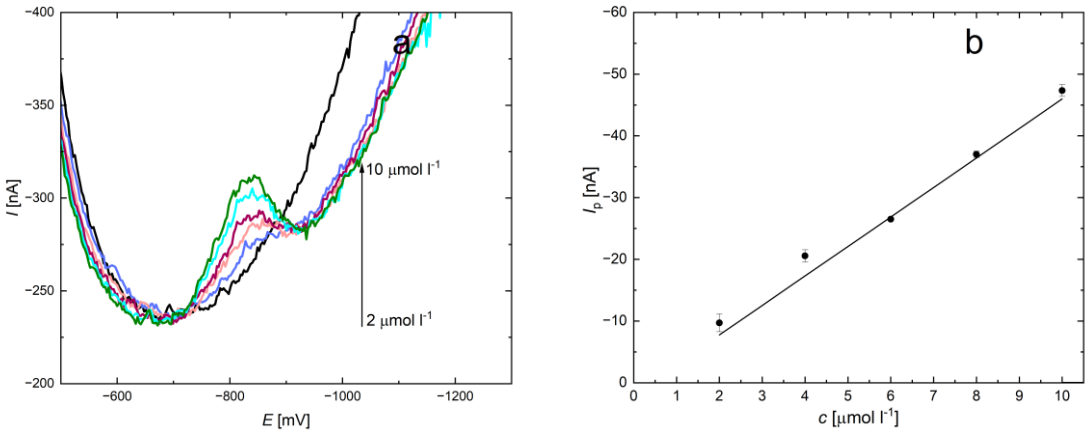
Obr. 3.26 DP voltamogramy nifedipinu (c = 1·10^{-4} mol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE v roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9 za přítomnosti Na_2SO_3 o různé koncentraci.

3.8.1 Kalibrační závislosti

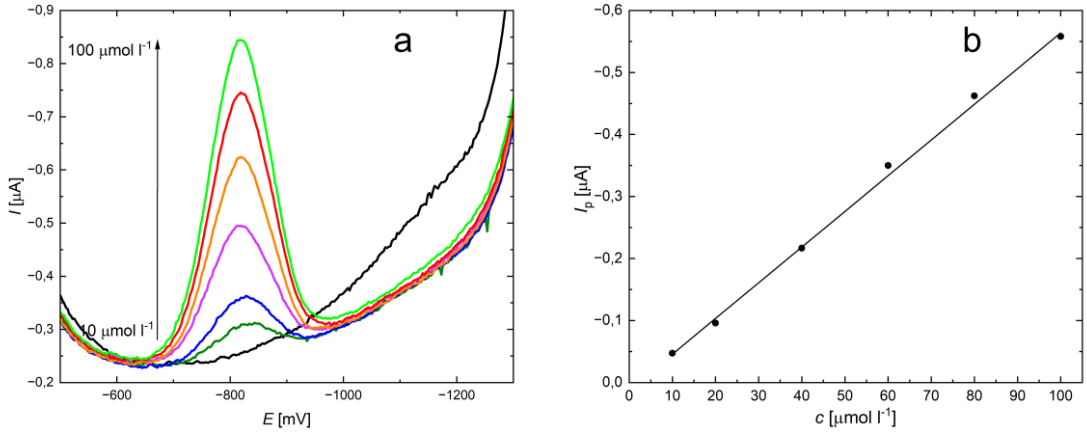
Kalibrační závislosti nifedipinu byly měřeny metodou DPV v koncentračním rozsahu 1 – 100 µmol l^{-1} v roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9 s přídavkem 100 µl nasyceného roztoku Na_2SO_3.

Na obr. 3.27 (a) jsou znázorněny voltamogramy nifedipinu o koncentraci 2 – 10 µmol l^{-1}, na obr 3.28 (a) jsou znázorněny voltamogramy nifedipinu o koncentraci 10 – 100 µmol l^{-1}, na obr 3.29 (a) jsou znázorněny voltamogramy nifedipinu o koncentraci 2 – 100 µmol l^{-1}.

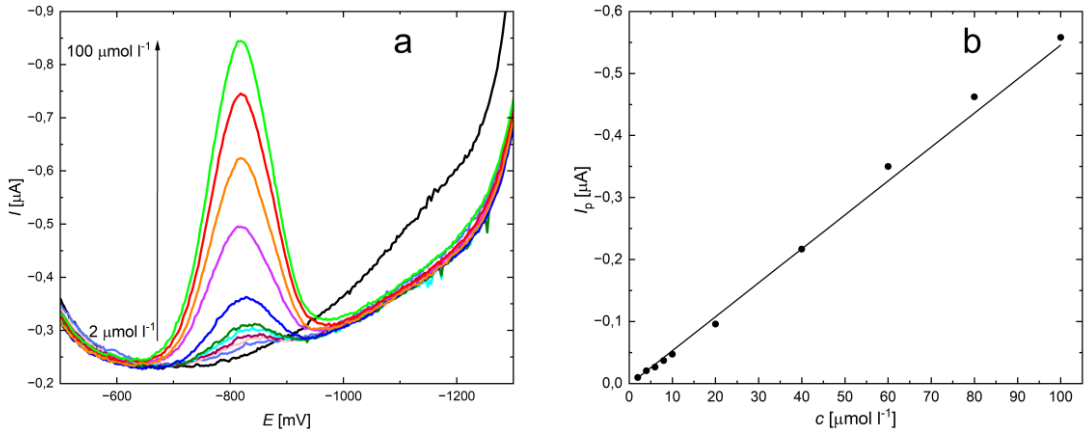
Kalibrační závislosti výšky píku na koncentraci nifedipinu jsou znázorněny na obr. 3.27 (b) pro nifedipin o koncentraci 2 – 10 µmol l^{-1}, na obr 3.28 (b) pro nifedipin o koncentraci 10 – 100 µmol l^{-1} a na obr 3.29 (b) pro nifedipin o koncentraci 2 – 100 µmol l^{-1}. Nejnižší vyhodnotitelná koncentrace nifedipinu v optimálním prostředí roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9 s přídavkem nasyceného roztoku Na_2SO_3 činila 2 µmol l^{-1}. Z grafu vyplývá, že získaná závislost je lineární v koncentračním rozsahu nifedipinu 2 – 100 µmol l^{-1}. V tabulce 3.9 jsou uvedeny jednotlivé parametry kalibračních přímek.



Obr. 3.27 (a) DP voltamogramy nifedipinu (c = 2 – 10 µmol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9 s přídavkem nasyceného roztoku Na_2SO_3. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci nifedipinu (c = 2 – 10 µmol l^{-1}); chybové úsečky pro n = 5; rovnice regrese: I_p [µA] = −0,00460c [µmol l^{-1}] − 0,0007; r^2 = 0,9929.



Obr. 3.28 (a) DP voltamogramy nifedipinu (c = 10 – 100 µmol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9 s přídavkem nasyceného roztoku Na_2SO_3. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci nifedipinu (c = 10 – 100 µmol l^{-1}); chybové úsečky pro n = 5; rovnice regrese: I_p [µA] = −0,00583c [µmol l^{-1}] + 0,0128; r^2 = 0,9977.



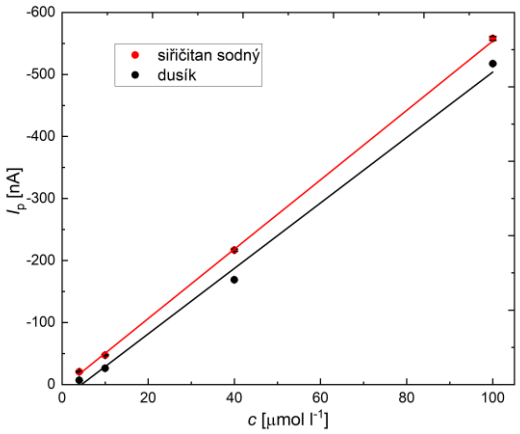
Obr. 3.29 (a) DP voltamogramy nifedipinu (c = 2 – 100 µmol l^{-1}) zaznamenané na SBiDE v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9 s přídavkem nasyceného roztoku Na_2SO_3. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci nifedipinu (c = 2 – 100 µmol l^{-1}); chybové úsečky pro n = 5; rovnice regrese: I_p [µA] = −0,00576c [µmol l^{-1}] + 0,0076; r^2 = 0,9985.

Tabulka 3.10

Parametry kalibračních přímek nifedipinu pro metodu DPV v prostředí roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9 s přídavkem nasyceného roztoku Na_2SO_3, měřeno na SBiDE.

c [µmol l^{-1}]	Směrnice [A l mol^{-1}]	Úsek [µA]	r^2	*LOQ* [µmol l^{-1}]	*LOD* [µmol l^{-1}]
2 – 10	−0,00460	0,0007	0,9929	3,6	1,1
10 – 100	−0,00583	0,0128	0,9977		
2 – 100	−0,00576	0,0076	0,9985		

Na obr. 3.30 je znázorněna závislost výšky píku na koncentraci nifedipinu. Tato závislost byla měřena v ten samý den a je tu ukázána pro porovnání citlivosti měření, kdy byl kyslík odstraněn probubláním dusíku anebo přidáním nasyceného roztoku Na_2SO_3. Z grafu můžeme vidět, že při odstranění kyslíku nasyceným roztokem Na_2SO_3 byla získána vyšší proudová odezva. Směrnice (citlivost) měření v daný den je v obou případech měření téměř shodná, což potvrzuje stabilitu metody. Proto i nadále můžeme pokračovat s měřením za použití nasyceného roztoku Na_2SO_3.



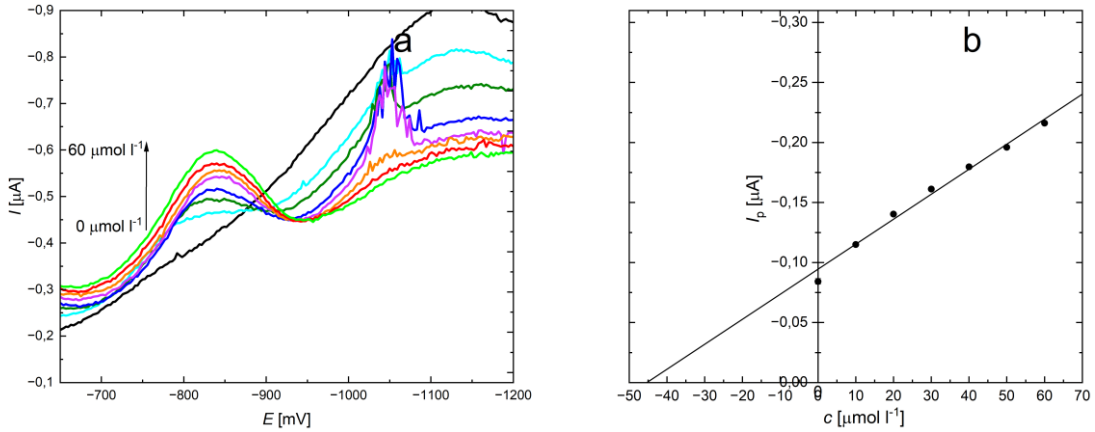
Obr. 3.30 Závislost výšky píku na koncentraci nifedipinu (c = 4 – 100 μmol l^{-1}) zaznamenaná na SBiDE v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9. Červená barva značí přídavek nasyceného roztoku Na_2SO_3 s rovnicí regrese: I_p [μA] = −0,0056 c [μmol l^{-1}] + 0,0062; r^2 = 0,9998. Černá barva značí použití dusíku s rovnicí regrese: I_p [μA] = −0,0054c [μmol l^{-1}] + 0,0027; r^2 = 0,9966. Chybové úsečky pro n = 5.

3.8.2 Voltametrické stanovení nifedipinu v lékové formě

Voltametrické stanovení množství nifedipinu v lékové formě Cordipin XL bylo prováděno pomocí metody přídavku standardu za dříve získaných optimálních podmínek s přídavkem 100 µl nasyceného roztoku Na_2SO_3. Příprava zásobních roztoků byla totožná jako v kapitole 3.3. Stanovení nifedipinu v lékové formě Cordipin XL probíhalo v koncentračním rozmezí přidaného standardu 10 – 60 µmol l^{-1}.

Na obr. 3.31 (a) jsou znázorněny DP voltamogramy nifedipinu v lékové formě Cordipin XL. V oblasti potenciálu 1050 mV došlo ke vzniku píku, který se s navyšující se koncentrací ztrácí. Tento pík mohl být způsoben reakcí určité látky, která je přítomna v zásobním roztoku lékové formy Cordipin XL, s nasyceným roztokem Na_2SO_3. Na obr. 3.31 (b) je znázorněna závislost výšky píku na koncentraci přidaného standardu nifedipinu.

V tabulce 3.10 jsou uvedeny parametry lineárních koncentračních závislostí přidaného standardu nifedipinu v lékové formě Cordipin XL. V tabulce 3.11 jsou uvedeny hodnoty spočteného množství nifedipinu v lékové formě Cordipin XL. V porovnání s výtěžností 78,8 %, která byla získána pomocí metody DPV, kde byl použit pro odstranění kyslíku dusík (viz kapitola 3.3), byla získána výtěžnost metodou DPV za přítomnosti nasyceného roztoku Na_2SO_3 vyšší o téměř 29 %, činila tedy 108,1 %. V tabulce 3.12 je zobrazeno porovnání voltametrického a spektrofotometrického stanoveného množství nifedipinu v lékové formě Cordipin XL. Po porovnání celková výtěžnosti nifedipinu činila 120,1 %, což o více jak 30 % více než po porovnání výsledků získaných metodou DPV s použitím dusíku (viz tabulka 3.4). Metoda DPV za použití dusíku pro stanovení množství nifedipinu v lékové formě Cordipin XL je tedy spolehlivější než metoda DPV s přídavkem Na_2SO_3, což do jisté míry může souviset také s přítomností výše popsaného interferujícího píku, jenž stanovení ovlivňoval.



Obr. 3.31 (a) DP voltamogramy nifedipinu ve vzorcích tvořených podílem lékové formy Cordipin XL a přidaným standardem analytu (c = 0 – 60 µmol l^{-1}). Měřeno na SBiDE metodou přídavku standardu v roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9 s přídavkem nasyceného roztoku Na_2SO_3. Černá barva značí základní elektrolyt. (b) Závislost výšky píku na koncentraci přidaného standardu nifedipinu v tabletě Cordipin XL (c = 0 – 60 µmol l^{-1}); chybové úsečky pro n = 5. Zaznamenáno na SBiDE.

Tabulka 3.10

Parametry lineárních koncentračních závislostí pro přidaný standard nifedipinu v lékové formě Cordipin XL získané pomocí metody DPV v prostředí roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9 s přídavkem nasyceného roztoku Na_2SO_3. Zaznamenáno na SBiDE.

Tableta Cordipin XL	$c_{\text{standard nifedipin}}$ [µmol l^{-1}]	Směrnice [mA l mol^{-1}]	Úsek [nA]	r^2
DPV	0 – 60	−2,13	−92,2	0,9884

Tabulka 3.11

Spočtené množství nifedipinu v lékové formě Cordipin XL vztahující se k deklarovanému množství nifedipinu na obalu přípravku. Měřeno pomocí metody DPV v prostředí roztoku BR pufr–EtOH (9:1) o pH 9 s přídavkem nasyceného roztoku Na_2SO_3. Zaznamenáno na SBiDE.

Tableta Cordipin XL	$c_{\text{standard nifedipin}}$ [µmol l^{-1}]	$m_{\text{deklarovaná}}$ [mg]	$m_{\text{vypočtená}}$ [mg]	w [%]
DPV	0 – 60	40	43,2	108,1

Tabulka 3.12

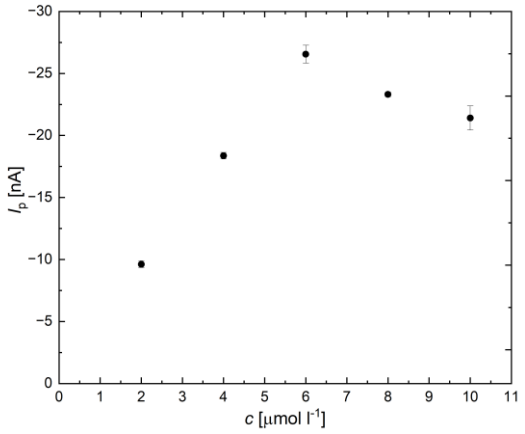
Hodnoty spočteného množství nifedipinu v lékové formě Cordipin XL vztahující se k deklarovanému množství nifedipinu na obalu přípravku. Získáno pomocí nově vyvinuté elektrochemické metody (w_{DPV}) a srovnávací analytické metody ($w_{\text{spektrometrie}}$). Poměr uvedených hodnot w_{DPV} / $w_{\text{spektrometrie}}$ představuje skutečnou výtěžnost metody DPV na SBiDE v porovnání s analytickou srovnávací metodou.

Léčivo	w_{DPV} [%]	$w_{\text{spektrometrie}}$ [%]	w_{DPV} / $w_{\text{spektrometrie}}$ [%]
Tableta Cordipin XL	108,1	90,0	120,1

3.8.3 Stanovení nifedipinu v autentických vzorcích pitné vody

Chování nifedipinu bylo zkoumáno metodou DPV za dříve získaných optimálních podmínek v autentickém vzorku pitné vody s přídavkem 100 µl 0,1mol l^{-1} chelatonu III (viz kapitola 3.5) a 100 µl nasyceného roztoku Na_2SO_3. Pitná voda byla odebrána z vodovodní sítě v budově Chemického ústavu Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Příprava roztoků byla totožná jako v kapitole 3.5.

Na obr 3.32 je znázorněna získaná závislost výšky píku na koncentraci nifedipinu v autentickém vzorku pitné vody s přídavkem chelatonu III a Na_2SO_3. Závislost byla měřena v rozsahu koncentrací 1 – 10 µmol l^{-1}. Z grafu je patrné, že získaná závislost není lineární ani s přídavkem chelatonu III, který má za úkol navázat ionty kovů tvořící komplexy. Důvodem by mohla být reakce mezi chelatonem III tvořící kovový komplex a nasyceným roztokem Na_2SO_3, který komplex může destabilizovat, a ovlivnit tak průběh měření.

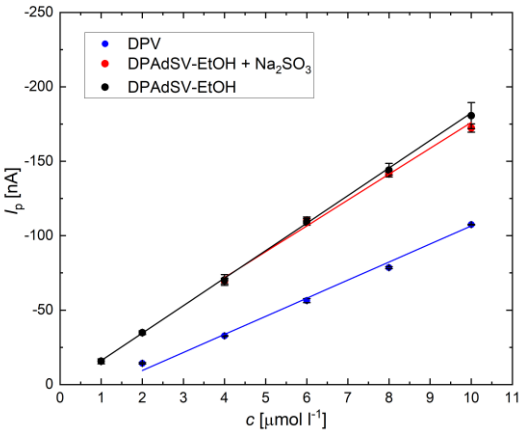


Obr. 3.32 Závislost výšky píku na koncentraci nifedipinu (c = 2 – 10 µmol l^{-1}) zaznamenaná na SBiDE v roztoku BR pufru o pH 9 metodou DPV s přídavkem nasyceného roztoku Na_2SO_3. Chybové úsečky pro n = 5.

3.8.4 Adsorpční rozpouštěcí voltametrie

Chování nifedipinu bylo také zkoumáno metodou DPAdSV v prostředí BR pufru o pH 11 se 100 µl nasyceného roztoku Na_2SO_3. Měření bylo prováděno s přídavkem ethanolu (jehož celkový objem v roztoku činil 1 ml) s akumulačním potenciálem $E_{akum_EtOH} = -800$ mV a akumulačním časem $t_{akum_EtOH} = 60$ s a bez přídavku ethanolu s $E_{akum} = -700$ mV a akumulačním časem $t_{akum} = 60$ s (viz kapitola 3.7). Příprava vzorků byla totožná jako v kapitole 3.7. Pokud v roztoku nebyl přítomen ethanol, nebylo možné naměřit čistou linii základního elektrolytu, a další měření bylo s přidaným nifedipinem zkreslené (data nejsou ukázána).

Na obr. 3.33 je znázorněno porovnání závislostí výšky píku na koncentraci nifedipinu měřené metodou DPAdSV s přídavkem ethanolu (DPAdSV–EtOH) (viz kapitola 3.7), DPAdSV s přídavkem ethanolu a Na_2SO_3 (DPAdSV–EtOH + Na_2SO_3) a metodou DPV (viz kapitola 3.1.3). Z grafu můžeme vidět, že proudová odezva měřena metodou DPAdSV–EtOH s přídavkem Na_2SO_3 je téměř srovnatelná s proudovou odezvou a směrnicí měřenou DPAdSV–EtOH. Rozdíl však mezi těmito měřeními je u nejnižší vyhodnotitelné koncentrace. U DPAdSV–EtOH nejnižší vyhodnotitelná koncentrace činí 1 µmol l^{-1} a u DPAdSV–EtOH + Na_2SO_3 nejnižší vyhodnotitelná koncentrace činí 4 µmol l^{-1}. V tabulce 3.13 jsou uvedeny parametry kalibračních přímek jednotlivých metod.



Obr. 3.33 Porovnání závislostí výšky píku na koncentraci nifedipinu (c = 1 – 10 µmol l^{-1}) zaznamenané za dříve získaných optimálních podmínek na SBiDE v roztoku BR pufru o pH 11 metodou DPV, DPAdSV–EtOH a DPAdSV–EtOH s přídavekm Na_2SO_3. Chybové úsečky pro n = 5.

Tabulka 3.13

Parametry kalibračních přímek nifedipinu pro porovnání metod DPV, DPAdSV–EtOH a DPAdSV–EtOH s přídavkem Na_2SO_3 v prostředí roztoku BR pufr o pH 11. Měřeno na SBiDE.

	Směrnice [A l mol^{-1}]	Úsek [μA]	r^2	*LOQ* [μmol l^{-1}]	*LOD* [μmol l^{-1}]
DPV	−0,0116	0,0118	0,9944	0,47	0,14
DPAdSV–EtOH	−0,0183	0,0022	0,9998	0,80	0,24
DPAdSV–EtOH + Na_2SO_3	−0,0169	0,0046	0,9949	0,43	0,13

3.9 Porovnání výsledků prvního a druhého měření na SBiDE po časovém odstupu

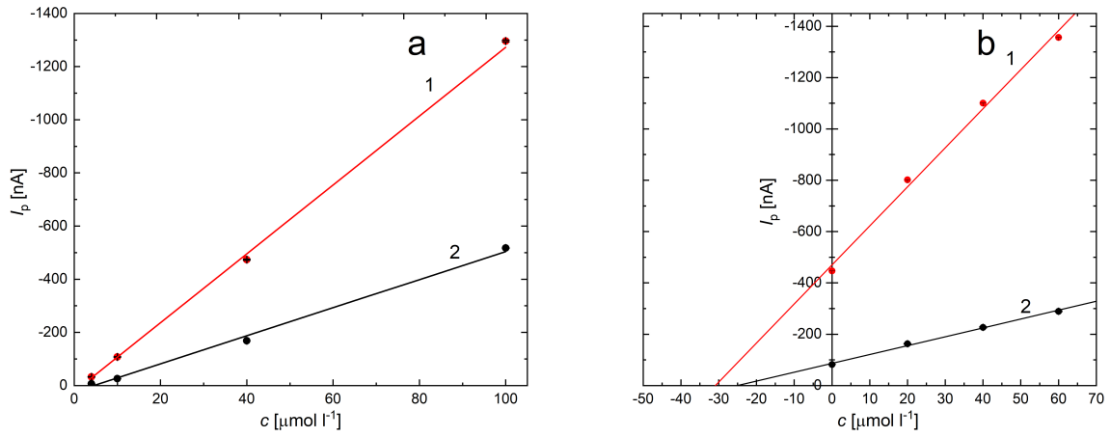
Jak už zde bylo zmíněno, SBiDE je velmi citlivá na vlivy z okolního prostředí, především na přítomnost vzdušného kyslíku (viz kapitola 2.3.4). Její vlastnosti se tedy postupem času mohou měnit. Přestože byla elektroda uchovávána po celou dobu vypracovávání diplomové práce při stejných podmínkách, vykazovala po několika týdnech při opakovaných měřeních odchylky v měření, zejména ve změně výšky proudové odezvy či citlivosti měření. Tyto změny mohou souviset se změnou povrchových vlastností nebo jinými faktory, které ovlivňují stabilitu elektrody.

Tento fakt je ukázán na obr. 3.34, kde (a) značí porovnání závislostí výšky proudové odezvy na koncentraci nifedipinu; měřeno za dříve získaných optimálních podmínek metodou DPV. Na obr. 3.34 (b) je znázorněno porovnání závislostí výšky proudové odezvy na koncentraci přidaného standardu nifedipinu při stanovení v lékové formě Cordipin XL; měřeno metodou přídavku standardu za dříve získaných optimálních podmínek pomocí metody DPV. První měření závislosti výšky proudové odezvy na koncentraci nifedipinu bylo zaznamenáno koncem srpna 2024. Druhé měření bylo zaznamenané začátkem ledna 2025. První měření závislosti výšky proudové odezvy na koncentraci přidaného standardu nifedipinu při stanovení v lékové formě Cordipin XL bylo zaznamenané na začátku října 2024. Druhé měření bylo zaznamenané v polovině ledna 2025. V obou případech bylo druhé měření uskutečněno v průběhu měření experimentální části diplomové práce.

Při druhém měření došlo ke snížení proudové odezvy. I když byla elektroda po celou dobu měření diplomové práce pravidelně čištěna pomocí čistícího elektrolytu, mohlo dojít s postupem času ke změně vlastností elektrody nebo ke změně aktivního povrchu elektrody pro elektrochemická měření. To může následně vést ke snížení proudové odezvy a citlivosti měření.

Jelikož i druhé měření probíhalo za dříve získaných optimálních podmínek, byla i zde použita elektrochemická regenerace. Změna vlastností elektrody mohla způsobit, že zvolené elektrochemické regenerační potenciály již nejsou pro její aktivaci optimální. Pro zvýšení citlivosti elektrody by bylo nejprve vhodné přistoupit k opětovné optimalizaci vyvinuté metody, respektive parametrů elektrochemické regenerace. Pokud by však tento

krok nevedl ke zvýšení citlivosti měření, mohlo by pomoct opětovné ponoření elektrody do koncentrované kyseliny dusičné po dobu 5 s (viz kapitola 2.3.3).



Obr. 3.34 (a) Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci nifedipinu (c = 2 – 100 µmol l^{-1}). Měřeno na SBiDE metodou DPV v roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9. (1) značí první měření s rovnicí regrese: I_p [µA] = −0,0132c [µmol l^{-1}] + 0,0298; r^2 = 0,9992, (2) značí druhé měření s rovnicí regrese: I_p [µA] = −0,00537c [µmol l^{-1}] + 0,0270; r^2 = 0,9966. Chybové úsečky pro n = 5. (b) Závislost výšky píku na koncentraci přidaného standardu nifedipinu v léčivu Cordipin XL (c = 0 – 60 µmol l^{-1}). Měřeno na SBiDE metodou přídavku standardu metodou DPV v roztoku BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9. (1) značí první měření s rovnicí regrese: y = −0,0151x + 0,589; r^2 = 0,9997, (2) značí druhé měření s rovnicí regrese: I_p [µA] = −0,00343c [µmol l^{-1}] + 0,0876; r^2 = 0,9960. Chybové úsečky pro n = 5.

3.10 Závěr

V této diplomové práci bylo zkoumáno využití nové komerční bismutové kapkové elektrody (SBiDE) pro voltametrické stanovení léčiva nifedipinu pomocí techniky diferenční pulzní voltametrie (DPV) a „direct current“ voltametrie (DCV).

Chování nifedipinu bylo zkoumáno v závislosti na pH roztoku Brittonova-Robinsonova pufru s přídavkem ethanolu (BR pufr–EtOH) v objemovém poměru 9:1. Jako optimální prostředí pro voltametrické stanovení nifedipinu byl vybrán roztok BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9. U obou voltametrických technik bylo dále zkoumáno, zda je zapotřebí zakomponovat elektrochemickou regeneraci povrchu pracovní elektrody, aby nedocházelo k její pasivaci. Byly zde zkoumány čtyři dvojice elektrochemických regeneračních potenciálů. Pro další měření technikou DPV byly vybrány elektrochemické regenerační potenciály $E_{in_r} = -600$ mV a $E_{fin_r} = -920$ mV. Další měření technikou DCV byla prováděna bez použití elektrochemické regenerace. Za takto zvolených optimálních podmínek byly změřeny koncentrační závislosti nifedipinu v rozmezí $2 \cdot 10^{-6} – 1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}. Technikou DPV byla zjištěna hodnota *LOQ* 0,47 μmol l^{-1} a *LOD* 0,14 μmol l^{-1}. Technikou DCV byla zjištěna hodnota *LOQ* 1,1 μmol l^{-1} a *LOD* 0,33 μmol l^{-1}.

Nově vyvinuté voltametrické metody byly pomocí metody přídavku standardu použity pro stanovení množství léčiva nifedipinu v lékové formě Cordipin XL. Naměřené výsledky zvolených voltametrických metod byly porovnány s hodnotami získanými pomocí srovnávací analytické metody UV–VIS absorpční spektrofotometrie v prostředí BR pufr–EtOH v poměru 9:1 o pH 9. Metodou DPV jsme získali obsah 78,8 % nifedipinu (uváděné jako hodnoty výtěžnosti v procentech) a metodou DCV jsme získali obsah 87,6 %. Výsledek metody DCV je téměř shodný se získaným výsledkem spektrofotometrie, tedy obsah 90,0 %. Nižší výtěžnost u DPV mohla být způsobena větší citlivostí této techniky na přítomné interferující látky.

Nově vyvinuté voltametrické metody byly taktéž použity při stanovení léčiva nifedipinu v autentických vzorcích pitné a říční vody. Koncentrační závislosti nifedipinu byly proměřeny v rozmezí 2 – 10 μmol l^{-1} s přídavkem 100 μl 0,1mol l^{-1} chelatonu III. Stanovení léčiva nifedipinu bylo možné provést pouze v autentickém vzorku pitné vody.

Cyklická voltametrie byla zde použita k prostudování elektrodových dějů při elektrochemické transformaci léčiva nifedipinu. Zkoumána byla prostředí BR pufr–EtOH

v poměru 9:1 o pH 3, 5, 7, 9 a 11. U pH 3, 5 a 7 se při všech rychlostech polarizace jedná o ireverzibilní děje. U pH 9 se při nižších rychlostech polarizace jedná o ireverzibilní děj a při vyšších rychlostech polarizace se jedná o děj kvazireverzibilní. U pH 11 se při nižších rychlostech polarizace jedná o ireverzibilní děj a při vyšších rychlostech polarizace se jedná o děj kvazireverzibilní. Proložením závislostí dekadického logaritmu proudu píku ($\log |I_p|$) na dekadickém logaritmu rychlosti polarizace ($\log v$) byly získány směrnice, podle kterých bylo možné určit, jakým krokem byly elektrodové děje na SBiDE kontrolovány.

Aplikovatelnost DPAdSV byla ověřena při stanovení nifedipinu v nejnižším koncentračním rozsahu 1 – 10 μmol l^{-1} v prostředí BR pufru o pH 11. Měření nejprve probíhalo s přídavkem ethanolu, kdy hodnota *LOQ* činila 0,80 μmol l^{-1} a *LOD* činila 0,24 μmol l^{-1}. Následně měření probíhalo bez přídavku ethanolu, kdy hodnota *LOQ* činila 0,52 μmol l^{-1} a *LOD* činila 0,16 μmol l^{-1}.

Aplikovatelnost nasyceného roztoku Na_2SO_3 jako redukčního činidla pro odstranění kyslíku byla za dříve získaných optimálních podmínek ověřena metodou DPV.

Za dříve získaných optimálních podmínek s přídavkem 100 μl nasyceného roztoku Na_2SO_3 byly proměřeny kalibrační závislosti v koncentračním rozmezí 2 – 100 μmol l^{-1}. Hodnota *LOQ* činila 3,6 μmol l^{-1} a *LOD* činila 1,1 μmol l^{-1}.

Dále byla metoda DPV s přídavkem 100 μl nasyceného roztoku Na_2SO_3 použita při stanovení léčiva nifedipinu v lékové formě Cordipin XL. Zvolenou metodou DPV jsme získali obsah 108,1 % nifedipinu (uváděné jako hodnoty výtěžnosti v procentech). Získaná výtěžnost je téměř o 29 % vyšší než výtěžnost získaná za použití dusíku. Metoda DPV pro stanovení množství nifedipinu v lékové formě Cordipin XL za použití dusíku pro odstranění interferujícího kyslíku je tedy spolehlivější než metoda DPV s přídavkem Na_2SO_3.

Aplikovatelnost Na_2SO_3 byla ověřena při stanovení nifedipinu v autentickém vzorku pitné vody. Závislost byla měřena v rozsahu koncentrací 1 – 10 μmol l^{-1}. Získaná závislost není lineární, důvodem by mohla být reakce mezi chelatonem III tvořící kovový komplex a nasyceným roztokem Na_2SO_3, který komplex může destabilizovat, a ovlivnit tak průběh měření.

Dále byla aplikovatelnost Na_2SO_3 ověřena při stanovení léčiva nifedipinu pomocí DPAdSV v prostředí BR pufru o pH 11. Měření bylo uskutečnitelné pouze za přítomnost ethanolu. Měření probíhalo v nejnižším koncentračním rozsahu od 1 – 10 μmol l^{-1} s nejnižší

vyhodnotitelnou koncentrací 4 μmol l^{-1}. Hodnota *LOQ* činila 0,43 μmol l^{-1} a *LOD* činila 0,13 μmol l^{-1}.

4. Literatura

1. Jarošová J.: *Využití pevné bismutové kapkové elektrody při stanovení léčiva metronidazolu.* Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha 2023. Bakalářská práce. Vedoucí práce: prof. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

2. Lezi N., Vyskočil V., Economou A., Barek J.: Electroanalysis of Organic Compounds at Bismuth Electrodes: A Short Review. *Sensing in Electroanalysis, Vol. 7*, str. 71−78. University Press Centre, Pardubice 2012.

3. Pauliukaite R., Hočevar S. B., Ogorevc B., Wang J.: Characterization and applications of a bismuth bulk electrode. *Electroanalysis* 16:9, 719−723 (2004). doi:10.1002/elan.200302783

4. Švancara I., Vytřas K.: Elektroanalýza s bismutovými elektrodami. *Chemické listy* 100:2, 90−113 (2006).

5. dos Santos U. D., De Souza D., Machado S. A. S.: A new approach in the electrochemical determination of folic acid in foods: Use of a polished silver solid amalgam electrode. *Journal of Analytical Chemistry* 78:1, 125−135 (2023). doi:10.1134/S1061934823010094

6. Tall O. E., Beh D., Jaffrezic-Renault N., Vittori O.: Electroanalysis of some nitro-compounds using bulk bismuth electrode. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 90:1, 40−48 (2009). doi:10.1080/03067310902871265

7. Bučková M., Gründler P., Flechsig G.: Adsorptive stripping voltammetric detection of daunomycin at a bismuth bulk electrode. *Electroanalysis* 17:5−6, 440−444 (2005). doi:10.1002/elan.200403178

8. Prchal V., Ottenschlagerova A., Vyskocil V., Barek J.: Voltammetric determination of 5-nitroindazole using a bismuth bulk electrode. *Analytical Letters* 49:1, 49−55 (2015). doi:10.1080/00032719.2014.996810

9. Majidian M., Raoof J. B., Fischer J., Barek J.: Differential pulse voltammetric determination of 2-methyl-4,6-dinitrophenol using bismuth bulk electrode. *Electroanalysis* 32:2, 317−322 (2020). doi:10.1002/elan.201800755

10. Węgiel K., Baś B.: Voltammetric characteristics and determination of clothianidin using a bismuth bulk annular band electrode regenerated in situ. *Ionics* 23:11, 3187−3195 (2017). doi:10.1007/s11581-017-2105-y

11. Prchal V., Vyskocil V., Barek J.: Determination of 2,4,6-trinitrophenol by differential pulse voltammetry at a bismuth bulk working electrode. *Journal of The Electrochemical Soc*iety 164:6, H316−H320 (2017). doi:10.1149/2.0861706jes

12. Mráček O., Vyskočil V.: Voltametrické stanovení metronidazolu pomocí stříbrné pevné elektrody. *Chemické listy* 115:12, 669−667 (2021).

13. Jarošová J., Vyskočil V.: Voltametrické stanovení léčiva metronidazolu pomocí pevné bismutové kapkové elektrody. *Chemické listy* 118, 615−624 (2024). doi:10.54779/chl20240615

14. Lović J., Bogdanović A., Tadić V., Mijin D., Vuković D., Petrović S., Ivić M. A.: Electrochemical behavior of duloxetine hydrochloride at Au and GC solid electrodes: Its quantitative determination and degradation. *Journal of The Electrochemical Soc*iety 169:7, 076507 (2022). doi:10.1149/1945-7111/ac7e74

15. Lović J., Bogdanović A., Mijin D., Vuković D., Petrović S., Ivić M. A.: Ticagrelor determination via its electrooxidation as the standard, in tablets and the spiked human serum at Au solid electrode. *International Journal of Electrochemical Science* 17:9, 220928 (2022). doi:10.20964/2022.09.36

16. İzi N., Göver T., Yazıcıgil Z.: Determination of ascorbic acid at solid electrodes modified with L-cysteine. *Journal of Electrochemical Science and Engineering* 13:2, 287−296 (2023). doi:10.5599/jese.1365

17. Svitková V., Vyskočil V.: Electrochemical behavior of methylene blue at bare and DNA-modified silver solid amalgam electrodes. *Journal of Solid State Electrochemistry* 26:11, 2491−2499 (2022). doi:10.1007/s10008-022-05270-3

18. Němcová V., Barek J., Vyskočil V.: Voltammetric determination of genotoxic 4-nitroindane at a mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode. *Electroanalysis* 36:5, 1−10 (2024). doi:10.1002/elan.202300376

19. Filho D. G., de Souza D.: Electrochemical determination of trifluralin herbicide using silver solid amalgam electrode: application in fresh food samples. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 32:7, 1456−1466 (2021). doi:10.21577/0103-5053.20210044

20. Metrohm: Bismuth drop electrode [online]. Dostupné z <https://www.metrohm.com/cs_cz/products/6/0346/60346000.html> [cit. 4.5.2025].

21. Metrohm: Bismuth drop electrode [online]. Dostupné z <https://www.metrohm.com/cs_cz/products/6/0346/60346000.html> [cit. 4.5.2025].

22. Gibilaro M., Bolmont S., Massot L., Latapie L., Chamelot P.: On the use of liquid metals as cathode in molten fluorides. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 726, 84−90 (2014). doi:10.1016/j.jelechem.2014.05.014

23. Jiang S., Liu K., Yin T., Chai Z., Shi W.: Electrochemical behavior of Th(IV) on the bismuth electrode in LiCl–KCl eutectic. *Journal of Nuclear Materials* 523, 268−275 (2019). doi:10.1016/j.jnucmat.2019.06.008

24. Shirai O., Iizuka M., Iwai T., Arai Y.: Electrode reaction of Pu^{3+}/Pu couple in LiCl–KCl eutectic melts: Comparison of the electrode reaction at the surface of liquid Bi with that at a solid Mo electrode. *Analytical Sciences* 17:1, 51−57 (2001). doi:10.2116/analsci.17.51

25. Shirai O., Uozumi K., Iwai T., Arai Y.: Electrode reaction of the Np^{3+}/Np couple at liquid Cd and Bi electrodes in LiCl–KCl eutectic melts. *Journal of Applied Electrochemistry* 34:3, 323−330 (2004).

26. Li M., Gu Q., Han W., Zhang X., Sun Y., Zhang M., Yan Y.: Electrochemical behavior of La(III) on liquid Bi electrode in LiCl–KCl melts. Determination of thermodynamic properties of La– Bi and Li–Bi intermetallic compounds. *RSC Advances* 5:100, 82471−82480 (2015). doi:10.1039/c5ra12723h

27. Castrillejo Y., Bermejo M. R., Arocas P. D., Martínez A. M., Barrado E.: The electrochemical behaviour of the Pr(III)/Pr redox system at Bi and Cd liquid electrodes in molten eutectic LiCl–KCl. *Journal of Electroanalitical Chemistry* 579:2, 343−358 (2005). doi:10.1016/j.jelechem.2005.03.001

28. Ravichandran S., Thiagarajan C., Kumar P. S.: pH sensitivity estimation in potentiometric metal oxide pH sensors using the principle of invariance. *International Journal of Chemical Engineering* 2021, 5551259 (2021). doi:10.1155/2021/5551259

29. Liao Y., Chou J.: Preparation and characterization of the titanium dioxide thin films used for pH electrode and procaine drug sensor by sol–gel method. *Materials Chemistry and Physics* 114, 542−548 (2009).

30. Chen M., Jin Y., Qu X., Jin Q., Zhao J.: Electrochemical impedance spectroscopy study of Ta_2O_5 based EIOS pH sensors in acid environment. *Sensors and Actuators B: Chemical* 192, 399−405 (2014). doi:10.1016/j.snb.2013.10.129

31. Razmi H., Heidari H., Habibi E.: pH-sensing properties of PbO_2 thin film electrodeposited on carbon ceramic electrode. *Journal of Solid State Electrochemistry* 12:12, 1579−1587 (2008). doi:10.1007/s10008-008-0523-5

32. Zhang W. D., Xu B.: A solid-state pH sensor based on WO_3-modified vertically aligned multiwalled carbon nanotubes. *Electrochemistry Communications* 11:5, 1038−1041 (2009). doi:10.1016/j.elecom.2009.03.006

33. Prats-Alfonso E., Abad L., Casañ-Pastor N., Gonzalo-Ruiz J., Baldrich E.: Iridium oxide pH sensor for biomedical applications. Case urea-urease in real urine samples. *Biosensors and Bioelectronics* 39:1, 163−169 (2013). doi:10.1016/j.bios.2012.07.022

34. Catro-Alarcón N., Herrera-Arizmendi J. L., Marroquín-Carteno L. A., Guzmán-Guzmán I. P., Pérez-Centeno A., Santana-Aranda M. Á.: Antibacterial activities of nanoparticles of titanium dioxide, intrinsic and doped with indium and iron. *Journal of Medicinal Chemistry and Toxicology* 4:4, 55−62 (2016). doi:10.15436/2575-808x.16.977

35. Sberveglieri G., Guidi V., Malagù C., Ferroni M., Comini V., Comini E., Faglia G.: Semiconductor metal oxide nanostructures. In: *Metal Oxide Nanostructures for Gas Sensing Applications*, str. 1–30. Elsevier, Cambridge 2023.

36. Zhuiykov S.: Morphology of Pt-doped nanofabricated RuO_2 sensing electrodes and their properties in water quality monitoring sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* 136:1, 248−256 (2009). doi:10.1016/j.snb.2008.10.030

37. Hassan S. S. M., Fathy M. A., Moussa I., Obaida M., Kamel A. H.: A novel miniaturized pH potentiometric electrode based on a nano bismuth oxide film deposited on a fluorine doped nano tin oxide glass substrate. *Sensors and Actuators B: Chemical* 380, 1−10 (2023). doi:10.1016/j.snb.2023.133397

38. Einerhand R. E. F., Visscher W. H. M., Barendrecht E.: pH measurement in strong KOH solutions with a bismuth electrode. *Electrochimica Acta* 34:3−4, 345−353 (1989). doi:10.1016/0013-4686(89)87010-0

39. Dickinson H. O., Rudge E. A.: Bismuth and arsenic electrodes. *Journal of the Society of Chemical Industry* 68:4, 101−102 (1949). doi:10.1002/jctb.5000680401

40. *Český lékopis*. Grada Publishing, Praha 2017.

41. Ronald R. H., Böcker, Guengerich F. P.: Oxidation of 4-aryl- and 4-alkyl-substituted 2,6-dimethyl-3,5-bis(alkoxycarbony1)-1,4-dihydropyridines by human liver microsomes and immunochemical evidence for the involvement of a form of cytochrome P-450. *Journal of Medical Chemistry* 29, 1596−1603 (1986). doi:10.1021/jm00159a007

42. Croom K. F., Wellington K.: Modified-release nifedipine: A review of the use of modified-release formulations in the treatment of hypertension and angina pectoris. *Drugs* 66:4, 497−528 (2006). doi:10.2165/00003495-200666040-00007

43. Meredith P. A., Elliott H. L.: A review of the gastrointestinal therapeutic system (GITS) formulation and its effectiveness in the delivery of antihypertensive drug treatment (focus on nifedipine GITS). *Integrated Blood Pressure Control* 6, 79−87 (2013). doi:10.2147/IBPC.S34803

44. Tulasamma P., Venkateswarlu P.: Spectrophotometric determination of nifedipine in pharmaceutical formulations, serum and urine samples via oxidative coupling reaction. *Arabian Journal of Chemistry* 9, S1603−S1609 (2016).

45. Sorkin E. M., Clissold S. P., Brogden R. N.: Nifedipine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy, in ischaemic heart disease, hypertension and related cardiovascular disorders. *Drugs* 30:1, 182−274 (1985). doi:10.2165/00003495-198530030-00002

46. Brogden R. N., Mctavish D.: Nifedipine. Gastrointestinal therapeutic system (GITS): A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in hypertension and angina pectoris. *Drugs* 50:3, 495−512 (1995). doi:10.2165/00003495-199550030-00007

47. Kiriyama A., Kimura S., Yamashita S.: Exploring the multiple effects of nifedipine and captopril administration in spontaneously hypertensive rats through pharmacokinetic-pharmacodynamic analyses. *Pharmacology Research and Perspectives* 12:4, 1−12 (2024). doi:10.1002/prp2.1249

48. Guengerich F. P., Sari M. A., Brian W. R., Iwasaki M., Bäärnhielm C., Berntsson P.: Oxidation of dihydropyridine calcium channel blockers and analogues by human liver cytochrome P-450 IIIA4. *Journal of Medical Chemistry* 34:6, 1838−1844 (1991). doi:10.1021/jm00110a012

49. Logoyda L.: HPLC-MS/MS method development for the quantitative determination of nifedipine for Caco-2 permeability assay. *Pharmacia* 37:2, 83−88 (2020). doi:10.3897/pharmacia.67.E50159

50. Horyn M., Logoyda L.: Bioanalytical method development and validation for the determination of metoprolol and meldonium in human plasma. *Pharmacia* 67:2, 39−48 (2020). doi:10.3897/pharmacia.67.E50397

51. Hasanuddin D. N. A., Garmana A. N., Sasongko L.: HPLC method for the determination of nifedipine in rat plasma: Development, validation, and application to pharmacokinetic drug-herb interaction study. *Pharmacia* 71, 1−6 (2024). doi:10.3897/pharmacia.71.e119198

52. Rashid M. A., Bilani M., Shazly G., Kazi M.: Development, validation and application of a novel UHPLC-UV method for the simultaneous determination of valsartan and nifedipine in the new formulation of self-nanoemulsifying drug delivery systems. *Separations* 9:11, 325 (2022). doi:10.3390/separations9110325

53. Zhao X., Li C., Zeng H., Gu X., Zheng J.: Determination of nitrobenzene potential genotoxic impurities in nifedipine with GC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 248, 116274 (2024). doi:10.1016/j.jpba.2024.116274

54. Al-Mashadani A. H., Mohammed D. H.: Spectrophotometric method for determination of nifedipine in pure form and its pharmaceutical preparation. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences* 54:4, 669−676 (2023). doi:10.21608/EJVS.2023.201769.1468

55. Scremin J., Sartori E. R.: Simultaneous determination of nifedipine and atenolol in combined dosage forms using a boron-doped diamond electrode with differential pulse voltammetry. *Canadian Journal of Chemistry* 96:1, 1−7 (2018). doi:10.1139/cjc-2017-0302

56. Madhusudana H. T., Jayarama R. S.: Differential pulse adsorptive stripping voltammetric determination of nifedipine and nimodipine in pharmaceutical formulations, urine, and serum samples by using a clay-modified carbon-paste electrode. *Analytical Letters* 37:10, 2079−2098 (2004). doi:10.1081/AL-200026681

57. Baghayeri M., Namadchian M., Karimi-Maleh H., Beitollahi H.: Determination of nifedipine using nanostructured electrochemical sensor based on simple synthesis of Ag nanoparticles at the surface of glassy carbon electrode: Application to the analysis of some real samples. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 397, 53−59 (2013). doi:10.1016/j.jelechem.2013.03.011

58. Wirzal M. D. H., Yusoff A. R. M., Zima J., Barek J.: Voltametric determination of nifedipine at a hanging mercury drop electrode and a mercury meniscus mofified silver amalgan electrode. *Journal of Electrochemical Science* 10, 4571−4584 (2015). doi:10.1016/S1452-3981(23)06646-4

59. Mokhtari B., Nematollahi D., Salehzadeh H.: Electrochemical simultaneous determination of nifedipine and its main metabolite dehydronifedipine using MWCNT modified glassy carbon electrode. *Journal of Molecular Liquids* 264, 543−549 (2018). doi:10.1016/j.molliq.2018.05.082

60. Gaichore R. R., Srivastava A. K.: Voltammetric determination of nifedipine using a β-cyclodextrin modified multi-walled carbon nanotube paste electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* 188, 1328−1337 (2013). doi:10.1016/j.snb.2013.08.052

61. Ghoneim M. M., Tawfik A., Khashaba P. Y.: Cathodic adsorptive stripping square-wave voltammetric determination of nifedipine drug in bulk, pharmaceutical formulation and human serum. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375:3, 369−375 (2003). doi:10.1007/s00216-002-1703-2

62. Diez-Caballero R. J. B., de la Torre L. L., Valentin J. F. A., Garcia A. A.: Adsorptive stripping voltammetry for the determination of nifedipine in human serum. *Talanta* 36:4, 501−504 (1989). doi:10.1016/0039-9140(89)80236-X

63. Özaltin N., Yardimci C., Süslü I.: Determination of nifedipine in human plasma by square wave adsorptive stripping voltammetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 30:3, 573−582 (2002). doi:10.1016/S0731-7085(02)00311-4

64. Khairy M., Khorshed A. A., Rashwan F. A., Salah G. A., Abdel-Wadood H. M., Banks C. E.: Simultaneous voltammetric determination of antihypertensive drugs nifedipine and atenolol utilizing MgO nanoplatelet modified screen-printed electrodes in pharmaceuticals and human fluids. *Sensors and Actuators B: Chemical* 252, 1045−1054 (2017). doi:10.1016/j.snb.2017.06.105

65. Kor K., Zarei K.: β-Cyclodextrin incorporated carbon nanotube paste electrode as electrochemical sensor for nifedipine. *Electroanalysis* 25:6, 1497−1504 (2013). doi:10.1002/elan.201200652

66. Zeng Q., Wei T., Wang M., Huang X., Fang Y., Wang L.: Polyfurfural film modified glassy carbon electrode for highly sensitive nifedipine determination. *Electrochimica Acta* 186, 465−470 (2015). doi:10.1016/j.electacta.2015.10.141

67. Yang X., Sun D., Xie X., Zhang H.: Sensitive and rapid determination of nifedipine using polyvinylpyrrolidone-modified carbon paste electrode. *Russian Journal of Electrochemistry* 50:5, 453−457 (2014). doi:10.1134/S1023193513110128

68. Agrawal N., Savalia R., Chatterjee S.: Nanostructured zinc oxide film amalgamated with functionalized carbon nanotubes for facile electrochemical determination of nifedipine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 201, 111635 (2021). doi:10.1016/j.colsurfb.2021.111635

69. Sojková V.: *Voltametrické stanovení léčiva nifedipin na grafitové kompozitní elektrodě.* Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha 2024. Bakalářská práce. Vedoucí práce: prof. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

70. Application Bulletin 438/1: Determination of cadmium and lead in water samples by anodic stripping voltammetry with a Bi drop electrode. Activation/cleaning of the Bi drop electrode [online].
Dostupné z <https://www.metrohm.com/cs_cz/applications/ab-application-bulletins/ab-438.html> [cit. 5.5.2025].

71. Şentürk Z., Özkan S. A., Özkan Y.: Electroanalytical study of nifedipine using activated glassy carbon electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 16:5, 801−807 (1998). doi:10.1016/S0731-7085(97)00120-9

72. Lolas M., Moggia C., Chacón F.: Harvest maturity, packaging and storage time related to calyx-end rot expression on Packham's Triumph pears under refrigerated storage. *Acta Horticulturae* 475, 459−469 (1998).

73. Brett C. M. A., Brett A. M. O.: *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*. Oxford University Press, Oxford 1993.