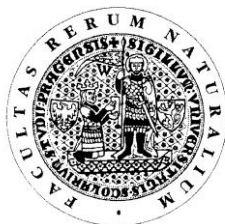


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Petr Samiec

Voltametrické stanovení diazepamu a nordiazepamu
na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě

Voltammetric determination of diazepam and nordiazepam on meniscus
modified silver solid amalgam electrode

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jan Fischer, Ph.D.

Praha 2012

Prohlášení

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

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

V Praze dne 13. srpna 2012

Předmětová hesla: benzodiazepiny
voltametrie
pevná amalgámová elektroda

Klíčová slova: diazepam, nordiazepam
diferenčně pulzní voltametrie, DC voltametrie
meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda

Abstrakt:

Byly vypracovány voltametrické metody pro stanovení diazepamu (DZ) a nordiazepamu (NDZ). Ke stanovení obou látek na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgánové elektrodě (m-AgSAE) byly použity techniky diferenčně pulzní voltametrie (DPV) a DC voltametrie (DCV). Byl sledován vliv pH^a prostředí směsi Brittonova-Robinsonova (BR) pufru a methanolu (9:1) a dále v 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a methanolu (9:1). Dále byla sledována stálost signálu při opakovaném měření v prostředí směsi 0,1 mol.l⁻¹ a methanolu (9:1) a dále v BR pufru pH 10,2 a methanolu (9:1). Při stanovení DZ technikou DPV a DCV bylo optimální prostředí 0,1 mol.l⁻¹ NaOH o pH^a o hodnotě 13,2. Při stanovení NDZ technikou DPV a DCV bylo optimální prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,2. Za těchto podmínek byly změřeny lineární kalibrační závislosti. Koncentrační rozsah BZ byl změřen pomocí techniky DCV v rozsahu $10 \cdot 10^{-5} - 6 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ a dále s technikou DPV v rozsahu $1 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹. Koncentrační rozsah NDZ byl změřen pomocí techniky DCV v rozsahu $1 \cdot 10^{-4} - 4 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ a dále s technikou DPV v rozsahu $1 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹. Mez stanovitelnosti byla vypočítána u DZ na $1 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ pomocí techniky DPV a $6,6 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ pomocí techniky DCV. Mez stanovitelnosti byla dále vypočítána u NDZ na $1,7 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ pomocí techniky DPV a $5,5 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ pomocí techniky DCV. Vyvinuté metody byly použity ke stanovení DZ ve vzorku léčiva Diazepam Slovakofarma 2 mg. Vzorek léčiva byl stanoven metodou standardního přídávku v prostředích 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a pitné vody (9:1) a 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a methanolu (9:1) pomocí techniky DPP. Touto metodou byla stanovena koncentrace $1,88 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹ v pitné vodě a $1,66 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹ v methanolu.

Subject headings: benzodiazepines
voltammetry
solid amalgam electrode

Key words: diazepam, nordiazepam
differential pulse voltammetry, DC voltmetry
meniscus modified silver solid amalgam electrode

Abstract:

Voltammetric methods for the determination of diazepam (DZ) and nordiazepam (NDZ) were developed. Techniques differential pulse voltammetry (DPV) and DC voltammetry for determination of both substances at meniscus modified silver solid amalgam electrode (m-AgSAE) were used. Effect of pH^a in media of mixture of Britton-Robinson buffer and methanol (9:1) and 0,1 mol.l⁻¹ NaOH was studied. Stability of the signal with repeated measurements in 0,1 mol.l⁻¹ and methanol (9:1) was monitored. Optimal pH^a 13,2 of 0,1 mol.l⁻¹ NaOH was used for determination of DZ by DPV and DCV techniques. Optimal pH^a 10,2 in media of mixture of Britton-Robinson buffer and methanol (9:1) was used for determination of NDZ by DPV and DCV techniques. Under these conditions were measured linear dependences in the calibration. Concentration range of DZ was measured with DCV in range of $1 \cdot 10^{-4} - 6 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ and DPV with DCV technique in range of $1 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹. Concentration range of NDZ was measured with DCV technique in range of $1 \cdot 10^{-4} - 4 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ and DPV technique in range of $1 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹. The limit of detection was calculated for DZ $6,6 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ with DCV and $1 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ with DPV. The limit of detection was calculated for NDZ $5,5 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ with DCV and $1,7 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ with DPV. Developed method were used for determination of DZ in the drug sample Diazepam Slovakofarma 2 mg. Drug sample was determined by standard addition method in 0,1 mol.l⁻¹ NaOH and drinking water (9:1) and in 0,1 mol.l⁻¹ NaOH and methanol (9:1) with DPV. Concentration of DZ in drinking water were determined at $1,88 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹ and in methanol at $1,66 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹.

Poděkování

Chtěl bych především poděkovat školiteli RNDr. Janu Fischerovi, Ph.D. za profesionální vedení, cenné rady a připomínky k této práci.

Současně bych rád poděkoval všem členům katedry analytické chemie za ochotu a pomoc, kterou mi poskytli.

Dále také děkuji zejména své rodině za umožnění studia na vysoké škole a podpory při studiu a vypracování této práce.

Tato diplomová práce byla finančně podporována MŠMT ČR (MSM 0021620857) a GAČR (projekt P206/10/P087).

Obsah

1. Úvod	9
1.1 Cíl práce	9
1.2 Studované látky	10
1.2.1 Příprava diazepamu a nordiazepamu	11
1.2.1 Vlastnosti a biologické účinky diazepamu a nordiazepamu.....	12
1.2.2 Použité metody	13
2. Experimentální část	14
2.1 Reagencie	14
2.2 Aparatura	15
2.3 Meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda	15
2.4 Pracovní postupy	16
2.4 Stálost zásobního roztoku.....	17
3. Výsledky a diskuze	20
3.1 Voltametrické stanovení diazepamu na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě pomocí DC voltametrie	20
3.2 Voltametrické stanovení diazepamu na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě pomocí DP voltametrie	30
3.3 Voltametrické stanovení nordiazepamu na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě pomocí DC voltametrie	47
3.4 Voltametrické stanovení nordiazepamu na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě pomocí DP voltametrie	55
4. Závěr	63
5. Literatura	65

Seznam použitých zkratk a symbolů

DZ	diazepam
NDZ	nordiazepam
BDZ	benzodiazepiny
A	absorbance [AU]
BR pufr	Brittonův - Robinsonův pufr
c	molární koncentrace [mol.l ⁻¹]
DCV	voltametrie s lineárně rostoucím proudem
DPV	diferenční pulzní voltametrie
E_p	potenciál píku u DPV, půlvlna potenciálu u DCV [mV]
I_p	proud píku u DPV, proud vlny u DCV [nA]
LOQ	mez stanovitelnosti [mol.l ⁻¹]
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
pH ^a	pH směsného vodně-methanolického roztoku
t	čas [s]
m-AgSAE	meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda
v	rychlost měření [mV/s]
N	pořadové číslo měření
C.A.S Registry Number	registrační číslo společnosti Chemical Abstract Service
E_{in}	kladnější regenerační potenciál
E_{fin}	zápornější regenerační potenciál
M_r	relativní molekulová hmotnost [g.mol ⁻¹]
SWV	square wave voltametrie
SWCSV	katodická rozpouštěcí square wave volumetrie
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
DPV	diferenčně pulzní voltametrie
CV	cyklická voltametrie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
GC	plynová chromatografie
GLC	plynová kapalinová chromatografie
ECD	detektor elektronového záchytu

Photo-Diode Array

diodové pole

UV

ultrafialová oblast

1. ÚVOD

1.1 Cíl práce

Předkládaná diplomová práce se zabývá vývojem elektrochemických metod pro stanovení psychoaktivních sloučenin. Tyto sloučeniny se využívají v lékařství jako sedativa, myorelaxancia. Právě do této skupiny látek patří i studované látky: diazepam, nordiazepam.

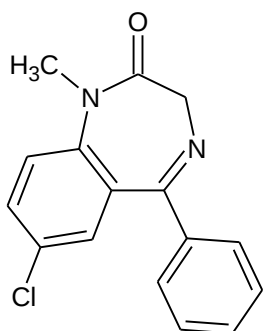
Cílem diplomové práce bylo nalezení optimálních podmínek pro stanovení diazepamu a nordiazepamu s cílem dosáhnout co nejnižší meze stanovitelnosti.

K dosažení těchto cílů byly využity voltametrické techniky diferenčně pulzní voltametrie (DPV), DC voltametrie (DCV) na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě (m-AgSAE).

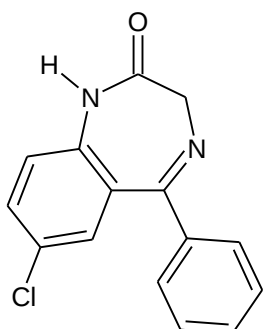
1.2 Studované látky

Studovanými látkami byly:

Diazepam (7-chlor-1-methyl-5-fenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on, struktura na Obr. 1.2.1) a Nordiazepam (7-chlor-5-fenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on, struktura na Obr. 1.2.2) jejichž základní vlastnosti jsou shrnuty v Tab. 1.2.1.



Obr. 1.2.1 Struktura Diazepamu



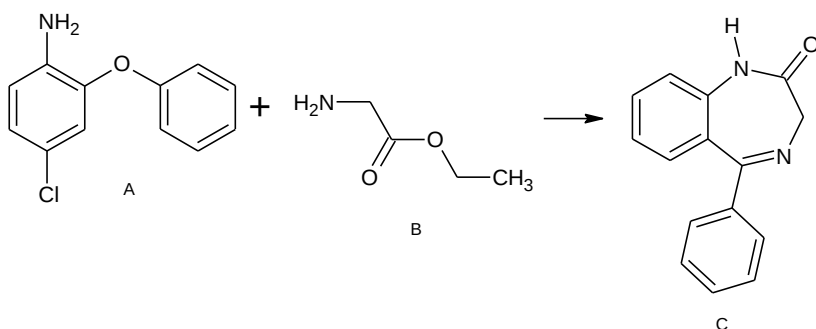
Obr. 1.2.2 Struktura Nordiazepamu

Tab. 1.2.1 Popis studovaných látek [1]

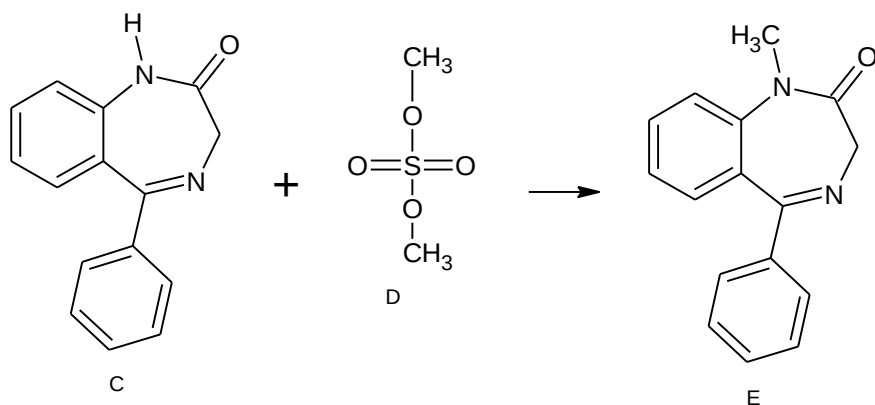
Studované látky	C.A.S REGISTRY	Sumární vzorec	M_r (g.mol ⁻¹)
Diazepam	439-14-5	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	284,7
Nordiazepam	1088-11-5	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O	270,7

1.2.1 Příprava diazepamu a nordiazepamu

Nejjednodušší příprava DZ a NDZ vychází ze základní látky 2-amin-5-chlorbenzofenonu (A), která reaguje s ethylesterem glycinu (B) za vzniku NDZ (C) [2]. Při přípravě DZ se vychází z NDZ (C), který reaguje s dimethylsulfátem (D) za vzniku DZ (E) [3]. Reakce jsou zobrazeny na Obr. 1.2.1.1 a Obr. 1.2.1.2.



Obr. 1.2.1.1 Příprava NDZ



Obr. 1.2.1.2 Příprava DZ

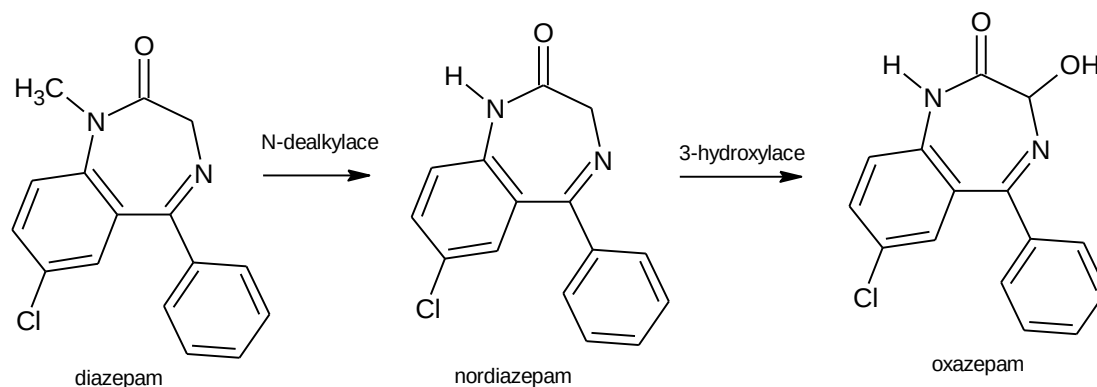
1.2.2 Vlastnosti a biologické účinky diazepamu a nordiazepamu

Diazepam (DZ) se průmyslově vyrábí jako léčivo. Prodává se pod různými obchodními názvy jako Apaurin, Seduxen, Stesolid, Diazepam Desitin [1, 4].

V lékařství se DZ využívá pro své antikonvulzivní a anxiolytické účinky [5, 6]. Léčiva s antikonvulzivním účinkem se podávají pacientům k zabránění vzniku křečí [7, 8]. U pacientů s depresemi se podávají anxiolytika, která snižují úzkost a strach [9, 10].

Nordiazepam (NDZ) se průmyslově vyrábí také jako léčivo [11]. Prodává se pod obchodními názvy Nordaz, Stilny, Madar, Calmday. Nordiazepam se používá pro svůj hypnotický účinek [1, 12].

BDZ se podávají orálně, injekčně. Vážou se na proteiny v plasmě a snadno se rozpouštějí v tucích [11, 12]. Ihned po vstupu do těla se lehce distribuují do všech tkání [10]. BDZ jsou eliminovány prostřednictvím metabolismu jater [13]. DZ je pomocí demethylace přeměněn na NDZ, který se následně hydroxyluje na oxazepam. Oxazepam je vyloučen z těla ven v moči [14, 15].



Obr. 1.2.2.1

Metabolická přeměna DZ v těle

BDZ můžeme rozdělit dle rychlosti poločas eliminace do tří skupin: pomalá, střední, rychlá [16]. Poločas eliminace je ovlivněn zejména těmito faktory jako

pohlavím, věkem a váhou [16,17]. Obě studované látky patří do skupiny pomalé eliminace, konkrétně u DZ je poločas eliminace 14 - 70 hodin a u NDZ je poločas eliminace 48 - 119 hodin [18].

Mezi nežádoucí účinky těchto látek patří vyšší návykovost, únava, bolest hlavy, svalová ochablost, porucha řeči a paměti [4, 19, 20].

1.2.3 Použité metody

Snadná elektrochemická redukovatelnost dvojné vazby v BDZ nám umožňuje použít elektroanalytické metody typu DPV a DC voltametrie [21, 22].

V současnosti se používají pevné elektrody na bázi tuhých amalgamů. To zejména proto, že vysoká toxicita par rtuti vedla k omezení využívání u rtuťových elektrod [23]. Mezi výhody použití pevných elektrod na bázi amalgamů patří netoxicitu, robustnost a snadná obsluha. Z tohoto důvodu byla zvolena pro stanovení těchto látek meniskem modifikovaná pevná stříbrná elektroda.

Výběr metody při stanovení DZ a NDZ závisí na biologické matrici a koncentraci analytu. Mezi další metody používané při analýze těchto látek patří: kapalná chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC), UV spektrofotometrie.

Tab. 1.2.3.1 Přehled vybraných metod zabývajících se stanovením BDZ

Studovaná látka	Matrice vzorku	Metoda/detektor	Mez detekce (mol.l ⁻¹)	Literatura
Diazepam	léčivo	SWV/HMDE	1.10 ⁻⁸	24
		SWCSV/HMDE	2. 10 ⁻⁹	24
	plazma, moč	DPV, CV s modifikovanou pastovou elektrodou	2,1.10 ⁻⁸	25
	hydrogel	HPLC/ UV	6,9.10 ⁻⁶	26
	plazma	GC/ECD	3,5.10 ⁻⁸	27
	čistá forma	UV	3.10 ⁻⁶	28
Nordiazepam	plazma	GC/MS	9,2.10 ⁻⁸	29
		GLC/EC	3, 5.10 ⁻⁸	30

2. Experimentální část

2.1 Reagencie

Zásobní roztoky DZ (Sigma-Aldrich, D0899), NDZ (Sigma-Aldrich, D7282), o koncentraci 1.10⁻³ mol.l⁻¹ byly připraveny rozpuštěním vypočítaného a přesně naváženého množství látky v 10 ml methanolu. Roztoky o nižších koncentracích pro měření kalibrační závislosti byly připraveny zředěním zásobního roztoku pomocí methanolu. Zásobní roztoky DZ a NDZ byly uskladněny v chladu a temnu.

Použité chemikálie:

Kyselina fosforečná 85%, kyselina boritá, kyselina octová 98%, hydroxid sodný, methanol, chlorid draselný (vše v čistotě p.a., Lachema Brno).

K přípravě deionizované vody byl použit systém (Milipore-Q plus systém, Millipore, USA).

Brittonovy-Robinsonovy pufrы o daném pH byly připraveny smícháním zásadité složky $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a kyselé složky obsahující kyselinu fosforečnou, kyselinu boritou a kyselinu octovou, každá o koncentraci $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$.

2.2 Aparatura

K voltametrickému měření byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 5.1 Pro, firma Polaro-Sensors, Praha, ČR. Tento software pracoval na operačním systému Windows XP. K voltametrickému měření byl použit tříelektrodový systém, tvořený referentní argentchloridovou elektrodou (3 mol.l^{-1} KCl) typu RAE 113, pomocnou platinovou elektrodou - plíšek typu PPE (Monokrystal, Turnov) a jako pracovní elektroda byla použita m-AgSAE (viz kapitola 2.3).

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Pye - Unicam PC 8800 UV/VIS Spectrophotometer (Cambridge, Velká Británie). Roztoky byly měřeny v křemenných kyvetách o tloušťce 1 cm.

Ke kalibraci pH-metru Jenway 4330 (Jenway, Essen, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005) byly použity kalibrační pufrы o pH o hodnotách 4, 7, 10 za laboratorní teploty.

2.3 Meniskem modifikovaná stříbrná amalgámová pevná elektroda

Při analýze DZ a NDZ byla použita m-AgSAE č. 04-2010-05 vyrobena firmou Polaro-Sensors o průměru 0,5 mm. Tento typ elektrody byl vyvinut v laboratoři ÚFCH JH AV.

Pro získání opakovatelných signálů byly s elektrodou prováděny tyto tři předúpravné kroky [32]:

Amalgamace: Pracovní elektrodu jsem ponořil do zásobníku kapalné rtuti přibližně na 10 s, než se obnovil celý meniskus. Amalgamace se prováděla po delším přerušení měření, tj. po dvou dnech.

Elektrochemická aktivace: Aktivace pracovní elektrody byla prováděna v roztoku $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ KCl při vloženém napětí $-2,2 \text{ V}$ po dobu 300 s . Elektrochemická aktivace slouží k vyčištění povrchu elektrody, byla prováděna ihned po amalgamací pracovní elektrody a po přibližně hodinovém přerušení měření.

Regenerace: Tento krok se prováděl v analyzovaném roztoku při míchání a probublávání roztoku. Na elektrodu bylo vkládáno skokové střídání konstantního kladnějšího potenciálu E_{in} a zápornějšího konstantního potenciálu E_{fin} v intervalech $0,1 \text{ s}$ po dobu 30 s .

2.4 Pracovní postupy

Diazepam

Při voltametrických měřeních bylo do odměrné baňky o objemu 10 ml odpipetováno dané množství zásobního roztoku studované látky ($0 - 1 \text{ ml}$) v methanolu, doplněno na objem 1 ml methanolem a následně doplněno BR pufr o zvoleném pH nebo vodným roztokem $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH po rysku. Tento roztok byl převeden do voltametrické cely, kyslík byl odstraněn probubláváním dusíkem po dobu 5 minut . Následně byla zaznamenána voltametrická křivka. Při každé změně pH nebo přerušení měření na dobu delší než 1 hodina byla elektroda znovu aktivována.

Při měření kalibračních závislostí byly vkládány regenerační pulzy, které jsou uvedeny v tabulce 2.4.1.

Tab. 2.4.1 Vkládané regenerační pulzy při měření kalibrační závislosti DZ, měřené technikou DPV na m-AgSAE v $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH.

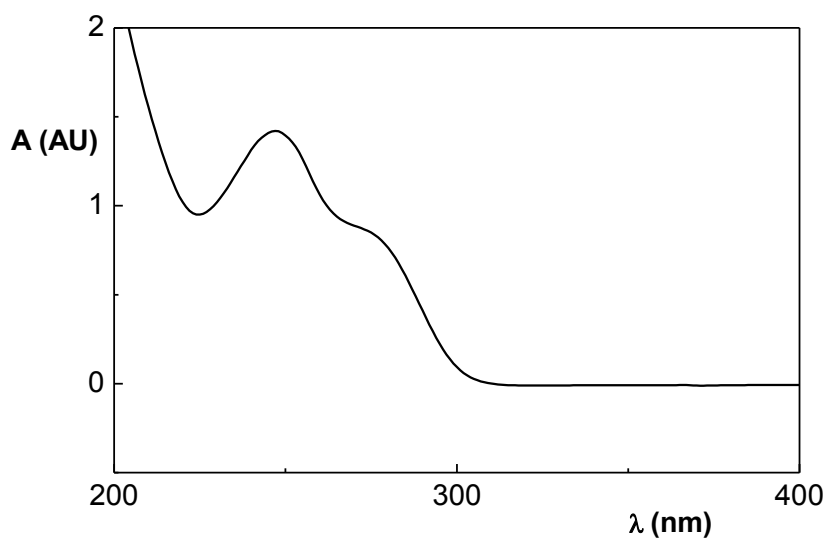
Studovaná látka	DZ	NDZ
E_{in}	-1000 mV	-800 mV
E_{fin}	1400 mV	-1400 mV
Prostředí	$0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanol (9:1)	BR pufr o pH 10 a methanol (9:1)

Při stanovení DZ ve vzorku léčiva byla nejdříve zvážena tableta (0,1112 g). Poté se jedna tableta rozpustila v 250 ml methanolu a odpipetovalo se 0,5 ml tohoto roztoku do každé ze tří odměrných baněk o objemu 10 ml. Do odměrných baněk se dále odpipetovalo příslušné množství roztoku DZ (0, 100, 200 μl o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$). Odměrné baňky byly doplněny 0,1 mol.l^{-1} NaOH. Při analýze DZ rozpouštěného v pitné vodě se postupovala následovně. Zvážená tableta (0,1118 g) byla rozpuštěna v 250 ml pitné vody. Z takto připraveného roztoku se odpipetovalo 0,5 ml do každé ze tří odměrných baněk o objemu 10 ml. Do odměrných baněk se dále odpipetovalo příslušné množství roztoku DZ (0, 100, 200 μl o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$). Odměrné baňky byly doplněny 0,1 mol.l^{-1} NaOH. Takto připravené roztoky byly použity pro voltametrické měření.

Všechna měření byla provedena třikrát a následně statisticky vyhodnocena. Tato měření byla prováděna při laboratorní teplotě.

2.5 Stálost zásobních roztoků

Stálost zásobních roztoků DZ a NDZ o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ v methanolu byla sledována spektrofotometricky v křemenných kyvetách o tloušťce 1 cm. Srovnávací kyveta byla naplněna methanolem. Absorbance zásobního roztoku DZ byla měřena při vlnové délce 246 nm a u roztoku NDZ byla měřena při vlnové délce 239 nm, kde měla studovaná látka absorpční maximum. Hodnota molárního absorpčního koeficientu při této vlnové délce činila $1,41 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l.cm}^{-1}$ pro DZ a $1,52 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l.cm}^{-1}$ pro NDZ. Absorpční spektrum DZ je uvedeno na Obr. 2.5.1 a výsledky měření stálosti zásobního roztoku jsou uvedeny v Tab. 2.5.1. Absorpční spektrum NDZ je uvedeno na Obr. 2.5.2 a výsledky měření stálosti zásobního roztoku jsou uvedeny v Tab. 2.5.2. Z měření vyplývá, že složení obou roztoků se během měsíce od připravení významně nemění, a proto je možné používat roztok po několik týdnů.



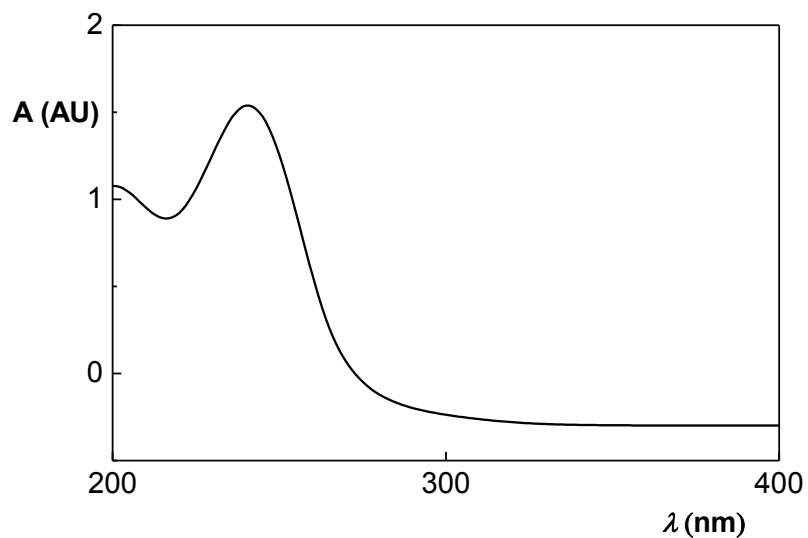
Obr. 2.5.1

Absorpční spektrum roztoku DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v methanolu. Měřeno proti methanolu v křemenné kyvetě o tloušťce 1 cm.

Tab. 2.5.1

Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku DZ o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ v methanolu. Číselné hodnoty udávají relativní hodnotu koncentrace v % proti hodnotě koncentrace čerstvě připraveného roztoku.

Dny	1	7	14	21	28
A_{246}	1,406	1,402	1,4	1,386	1,380
(%)	100	99,7	99,6	98,6	98,2



Obr 2.5.2

Absorpční spektrum roztoku NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v methanolu. Měřeno proti methanolu v křemenné kyvetě o tloušťce 1 cm.

Tab. 2.5.2

Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku NDZ o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ v methanolu. Číselné hodnoty udávají relativní hodnotu koncentrace v % proti hodnotě koncentrace čerstvě připraveného roztoku.

Dny	1	7	14	21	28
A_{239}	1,502	1,494	1,482	1,49	1,493
(%)	100	99,5	98,6	99,2	99,4

3 Výsledky a diskuze

3.1 Voltametrické stanovení diazepamu na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě pomocí DC voltametrie

Ke zjištění závislosti intenzity signálu DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na velikosti pH^a směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0 byla použita technika DC voltametrie. Látka v této oblasti pH^a poskytovala jeden signál. Pro lepší přehled jsou naměřené voltametrické křivky znázorněny na Obr. 3.1.1.

Metodou lineární regrese byla prokázána lineární závislost intenzity signálu DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na velikosti pH^a ve směsi BR pufru a methanolu (9:1). Touto metodou byl vypočten vztah pro závislost potenciálu vlny E_p na pH^a roztoku v rozsahu pH^a 2,1 – 12,0:

$$E_p(\text{mV}) = -56,5 \text{ pH}^a - 557,281 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9967)$$

Hodnoty E_p a I_p pro měřená pH^a roztoku jsou shrnuty do Tab. 3.1.1 a jejich závislosti vyneseny do Obr. 3.1.2 a Obr. 3.1.3.

Jako optimální prostředí z rozmezí hodnot pH^a 2,1 – 12,0 bylo nejprve vybráno prostředí BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 12,0. Následně bylo porovnáno prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a 12,0 s roztoky NaOH (o koncentraci $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ a $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$) a methanolu (9:1), pro které jsou voltamogramy zobrazeny na Obr. 3.1.4. Jako nové optimální prostředí pro analýzu DZ bylo zvoleno prostředí v $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH, kde DZ poskytoval nejvyšší intenzitu signálu.

Závislost stability signálu DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na opakovaném měření v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) je zobrazena na Obr. 3.1.5. Z tohoto obrázku je patrný pokles signálu (RSD 7,1% pro 40 měření). Míra poklesu

byla přijatelná pro analytické stanovení látky, a proto nebyla prováděna další optimalizace.

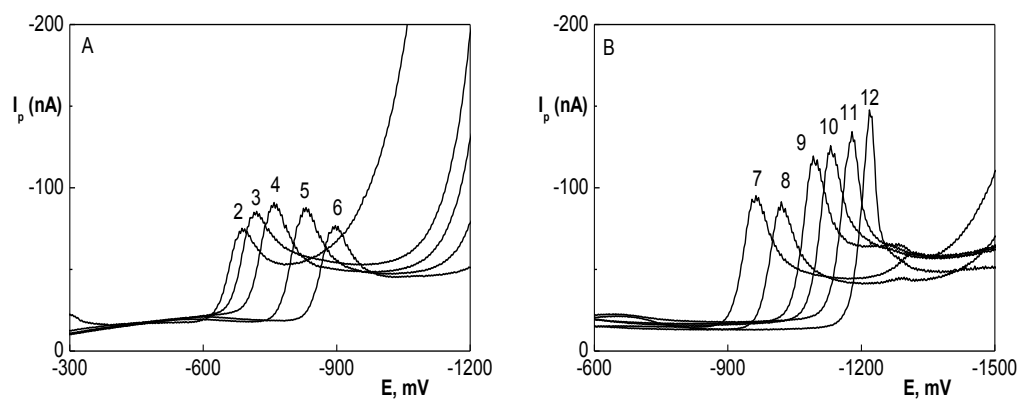
Dále byla zkoumána závislost citlivosti měření na rychlosti skenu 5, 10, 15, 25, 50, 100, 200, 400 mV.s^{-1} DZ ($c = 10 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) pomocí DCV na m-AgSAE v prostředí 0,1 mol.l^{-1} NaOH a methanolu (9:1). Tato závislost je zobrazena na Obr. 3.1.6. Z tohoto obrázku je patrné, že poměr šumu a signálu zůstává konstantní do 15 mV.s^{-1} a výrazně začíná narůstat až od 25 mV.s^{-1} , proto byla zvolena jako optimální rychlost skenu 20 mV.s^{-1} . Závislost poměru šumu a I_p na rychlosti skenu jsou shrnuty do Tab. 3.1.2.

Koncentrační závislost DZ byla měřena pomocí techniky DCV na m-AgSAE v prostředí 0,1 mol.l^{-1} NaOH a methanolu (9:1) s vkládanými regeneračními pulzy. Byly měřeny koncentrační rozsahy $(2 - 10) \cdot 10^{-5}$ a $(6 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Nižší koncentrace nebyly měřeny kvůli obtížnému vyhodnocení DC voltametrické vlny DZ při nízkých koncentracích.

Kalibrační závislost DZ v koncentračním rozsahu $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a související závislost velikosti proudu na koncentraci byla zobrazena na Obr. 3.1.7 a Obr. 3.1.8.

Kalibrační závislost DZ v koncentračním rozsahu $(6 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a související závislost velikosti proudu na koncentraci byla zobrazena na Obr. 3.1.9 a Obr. 3.1.10.

Mez stanovitelnosti byla stanovena z opakovaných měření při koncentraci $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ (zobrazena na Obr. 3.1.11). Relativní směrodatná odchylka z těchto měření byla 10,2%, čemuž odpovídá mez stanovitelnosti $6,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$.



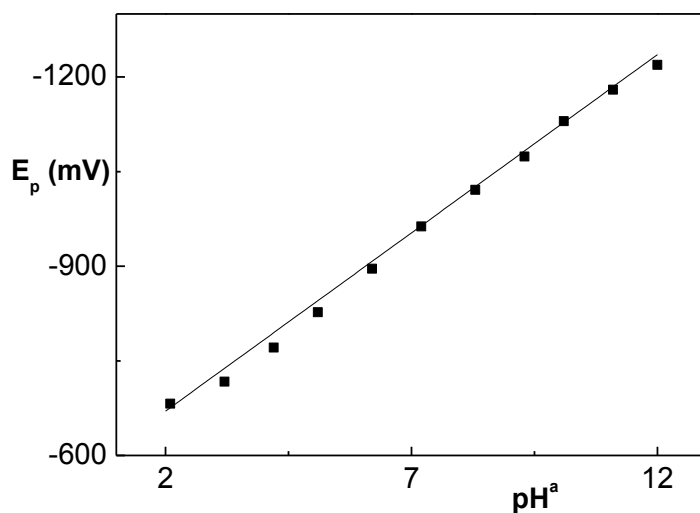
Obr. 3.1.1

DC voltamogramy DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) byly měřeny technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1), měření byla prováděna bez regenerace elektrody. Čísla nad voltamogramy odpovídají danému pH roztoku při různých pH.

Tab. 3.1.1

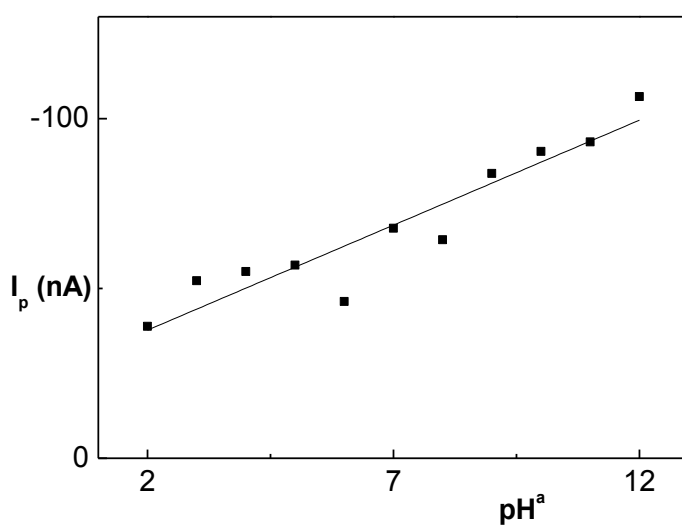
Hodnoty E_p a I_p roztoku DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v prostředích o různých pH^a byly měřeny na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) při různých měřeních.

Prostředí	pH^a	E_p (mV)	I_p (nA)
směs BR pufru pH 2,0 a methanolu (9:1)	2,1	-687	-38,87
směs BR pufru pH 3,0 a methanolu (9:1)	3,2	-717	-52,24
směs BR pufru pH 4,0 a methanolu (9:1)	4,2	-758	-54,97
směs BR pufru pH 5,0 a methanolu (9:1)	5,1	-827	-56,88
směs BR pufru pH 6,0 a methanolu (9:1)	6,2	-896	-46,26
směs BR pufru pH 7,0 a methanolu (9:1)	7,2	-963	-67,43
směs BR pufru pH 8,0 a methanolu (9:1)	8,3	-1021	-64,31
směs BR pufru pH 9,0 a methanolu (9:1)	9,3	-1094	-83,85
směs BR pufru pH 10,0 a methanolu (9:1)	10,1	-1123	-90,34
směs BR pufru pH 11,0 a methanolu (9:1)	11,1	-1160	-93,15
směs BR pufru pH 12,0 a methanolu (9:1)	12,0	-1180	-106,5
Roztok NaOH ($0,01 \text{ mol.l}^{-1}$) o pH 12 a methanolu (9:1)	12	-1209	-99,6
Roztok NaOH ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$) o pH 13,1 a methanolu (9:1)	13,2	-1240	-109,2



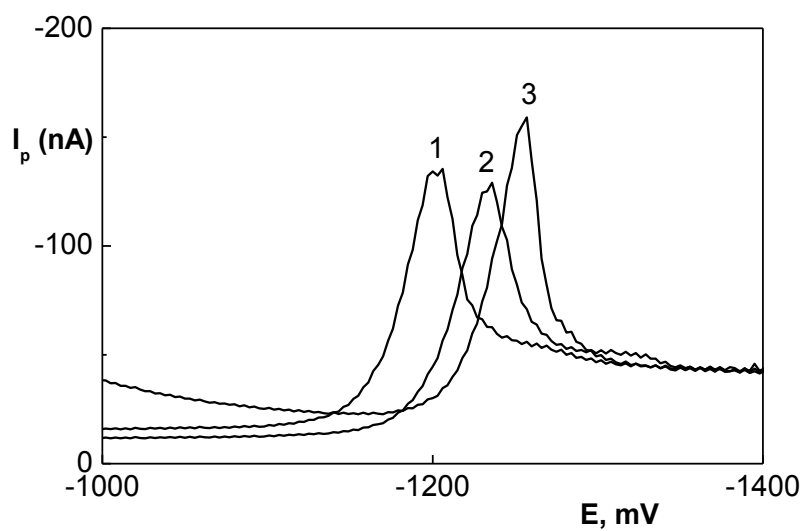
Obr. 3.1.2

Závislost potenciálu vlny E_p DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^a roztoku byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0.



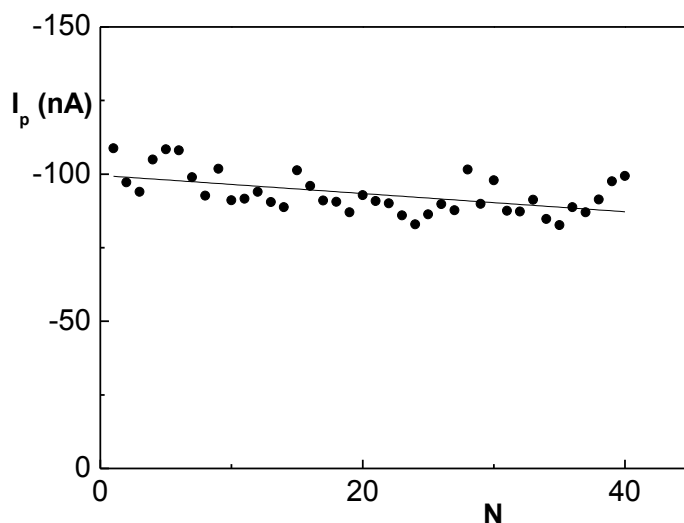
Obr. 3.1.3

Závislost proudu vlny I_p DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^a roztoku byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0.



Obr. 3.1.4

DC voltamogramy DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) byly měřeny technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru pH 12,0 a methanolu (9:1) (1), $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) (2), $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) (3). Měření byla prováděna bez regenerace pracovní elektrody.

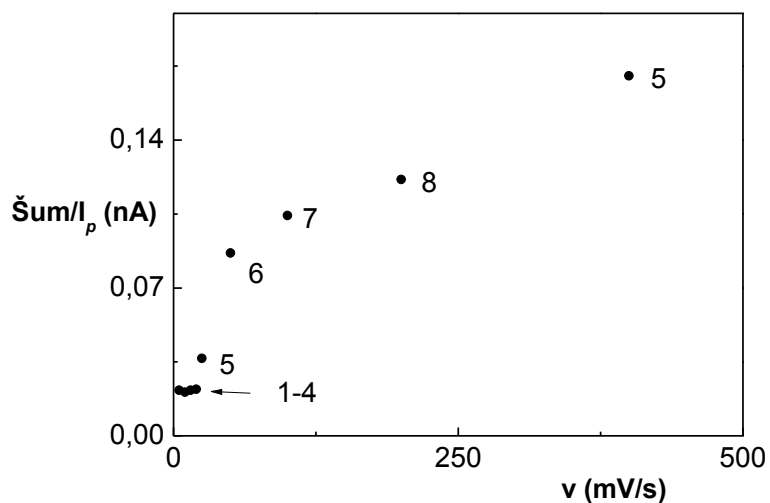


Obr. 3.1.5

Závislost stability signálu DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na opakovaném měření byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) (RSD 7,1% pro 40 měření). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.

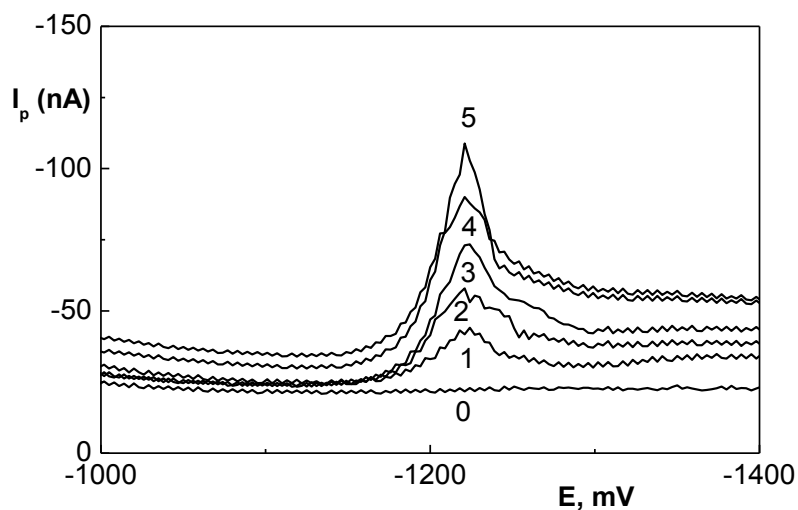
Tab. 3.1.2 Závislost šumu na rychlosti skenu.

Rychlost (mV/s)	Šum (nA)	I_p (nA)	Šum/ I_p
5	-0,0973	-4,498	0,0216
10	-0,153	-7,39	0,0207
15	-0,166	-7,669	0,0216
20	-0,172	-7,745	0,022
25	-0,372	-10,13	0,0367
50	-0,8749	-10,1	0,0866
100	-1,36	-13,04	0,1043
200	-2,041	-16,81	0,1214
400	-3,044	-17,86	0,1704



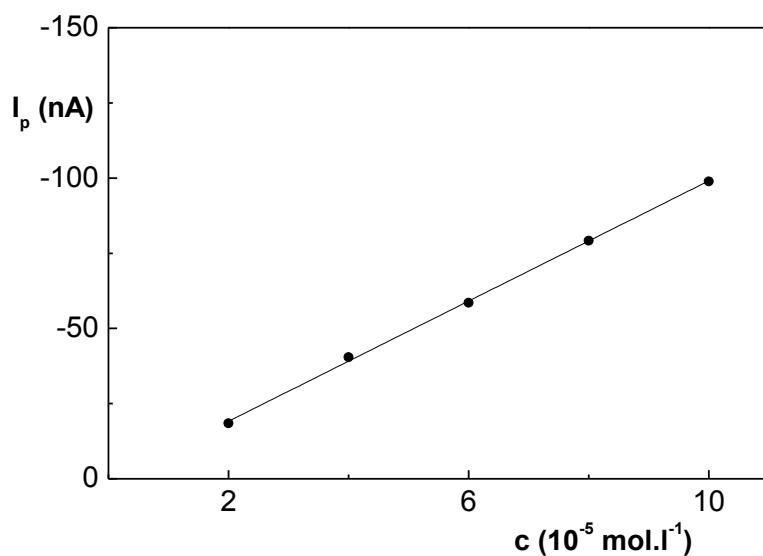
Obr. 3.1.6

Závislost šumu křivky I_p DZ ($10 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) na rychlosti skenu. Toto měření bylo prováděno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV . Měřené rychlosti: $5, 10, 15, 20 \text{ mV/s}$ (1 - 4); 25 mV/s (5); 50 mV/s (6); 100 mV/s (7); 200 mV/s (8); mV/s (9).



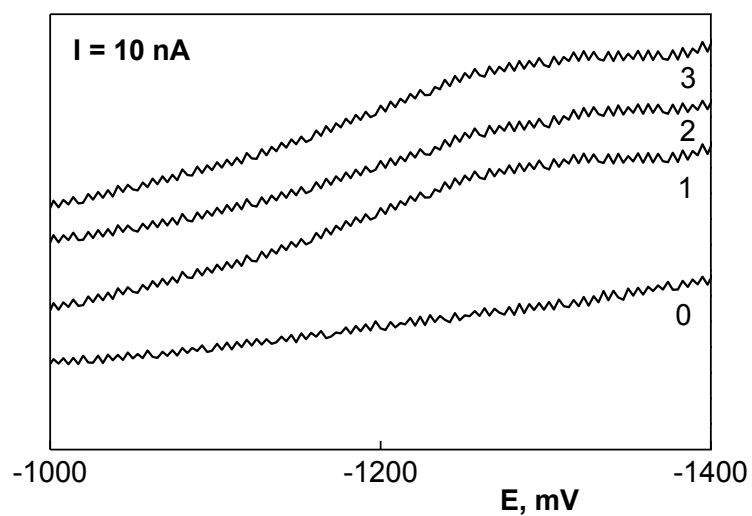
Obr. 3.1.7

DC voltamogramy DZ byly měřeny technikou DCV na m-AgSAE v prostředí 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a methanolu (9:1). Koncentrace (DZ): 0 (0); 2.10⁻⁵ (1); 4.10⁻⁵ (2); 6.10⁻⁵ (3); 8.10⁻⁵ (4); 10.10⁻⁵ (5) mol.l⁻¹. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.



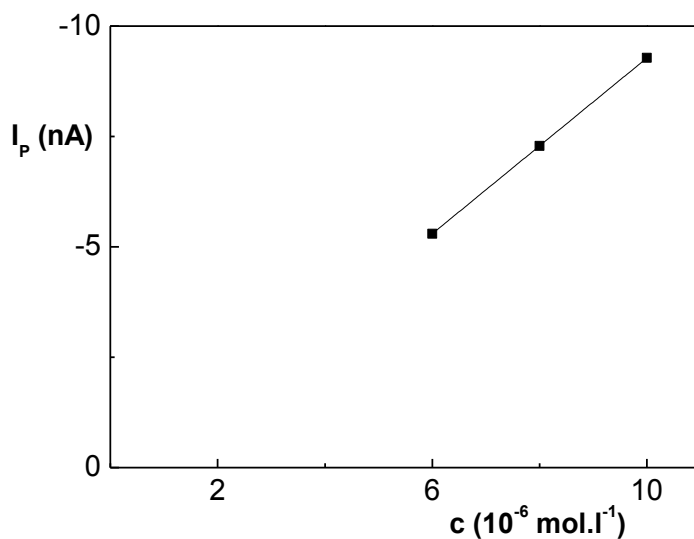
Obr. 3.1.8

Závislost proudu vlny I_p na koncentraci DZ v rozmezí 2.10⁻⁵ – 10.10⁻⁵ mol.l⁻¹ byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a methanolu (9:1). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.



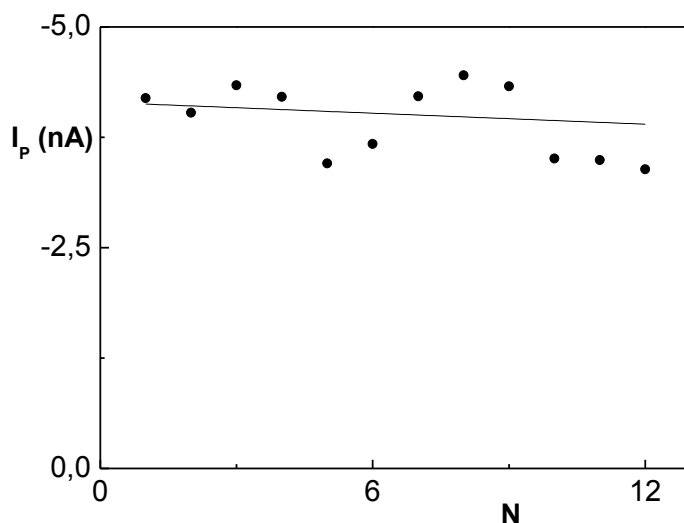
Obr. 3.1.9

DC voltamogramy DZ byly měřeny technikou DCV na m-AgSAE v prostředí $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1). Koncentrace (DZ): 0 (1); $6 \cdot 10^{-6}$ (2); $8 \cdot 10^{-6}$ (3); $10 \cdot 10^{-6}$ (4) mol.l^{-1} .



Obr. 3.1.10

Závislost proudu vlny I_p na koncentraci DZ v rozmezí $6 \cdot 10^{-6}$ - $10 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.



Obr. 3.1.11

I_p DZ při opakovaných měřeních byl měřen technikou DCV na m-AgSAE v prostředí $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) pH^a . Měřená koncentrace (DZ) byla $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$.

Tab. 3.1.3

Parametry kalibrační přímky pro stanovení DZ metodou DCV m-AgSAE v prostředí $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) pH^a . Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.

c [mol.l ⁻¹]	Směrnice [nA.mol ⁻¹ .l]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	LOQ [mol.l ⁻¹]
$(2-10) \cdot 10^{-5}$	-0,1	-0,8	0,996	-
$(6-10) \cdot 10^{-6}$	$-0,675 \cdot 10^{-7}$	- 0,995	0,997	$6,6 \cdot 10^{-6}$

3.2 Voltametrické stanovení diazepamu na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě pomocí DP voltametrie

Ke zjištění závislosti intenzity signálu DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na velikosti pH^a ve směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0 byla použita technika DPV. Látka v této oblasti pH^a poskytovala jeden signál. Velikost pH^a směsi

vodně-methanolického roztoku se nelišila výrazně od pH vodného roztoku. Pro lepší přehled jsou naměřené voltametrické křivky znázorněny na Obr. 3.2.1.

Metodou lineární regrese byla prokázána lineární závislost intenzity signálu DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na velikosti pH^a ve směsi BR pufru a methanolu (9:1). Touto metodou byl vypočten vztah pro závislost potenciálu vlny E_p na pH^a roztoku v rozsahu pH^a 2,1 – 12,0:

$$E_p(\text{mV}) = -50,109 \text{ pH}^a - 585,236 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9963)$$

Hodnoty E_p a I_p DZ pro měřená pH^a roztoku jsou shrnuty v Tab. 3.2.1 a jejich závislosti vyneseny do Obr. 3.2.2 a Obr. 3.2.3.

Jako optimální prostředí z rozmezí hodnot pH^a 2,1 – 12,0 bylo nejprve vybráno prostředí BR pufru o pH^a o hodnotě 12,0. Následně bylo porovnáno prostředí BR pufru a methanolu (9:1) o hodnotě pH^a 12,0 s roztoky NaOH (o koncentracích $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ a $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$) a methanolu (9:1), pro které jsou voltamogramy zobrazeny na Obr. 3.2.4. Jako nové optimální prostředí pro analýzu DZ bylo zvoleno prostředí v $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH, kde signál DZ poskytoval nejvyšší intenzitu.

Byla sledována závislost stability signálu DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na opakovaném měření v prostředí BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a 12,0 a roztoku NaOH o koncentraci $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ a methanolu (9:1) a NaOH o koncentraci $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ a methanolu (9:1) s vkládanými regeneračními pulzy, které jsou zobrazeny na Obr. 3.25. Z tohoto obrázku je patrné, že nejstabilnější signál poskytuje $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH s vkládanými regeneračními pulzy.

Z Obr. 3.2.5 je patrná klesající stabilita signálu v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 12,0 (RSD 8,9% pro 34 měření). V prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) je patrný stabilnější signál (RSD 8,6% pro 34 měření). Nejstabilnější signál poskytovalo prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) s vkládanými regeneračními pulzy (2,4%).

Byla sledována stabilita signálu technikou DPV na opakovaném měření (1, 20, 30) DZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v prostředích směsí BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a 12,0 a 0,1 mol.l^{-1} NaOH a methanolu (9:1), jsou zobrazeny na Obr. 3.2.6 a Obr. 3.2.7.

Kalibrační závislost DZ byla měřena pomocí techniky DPV NA m-AgSAE v prostředí 0,1 mol.l^{-1} NaOH s vkládanými regeneračními pulzy. Byly měřeny koncentrační rozsahy $(2 - 10).10^{-5}$ a $(2 - 10).10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$.

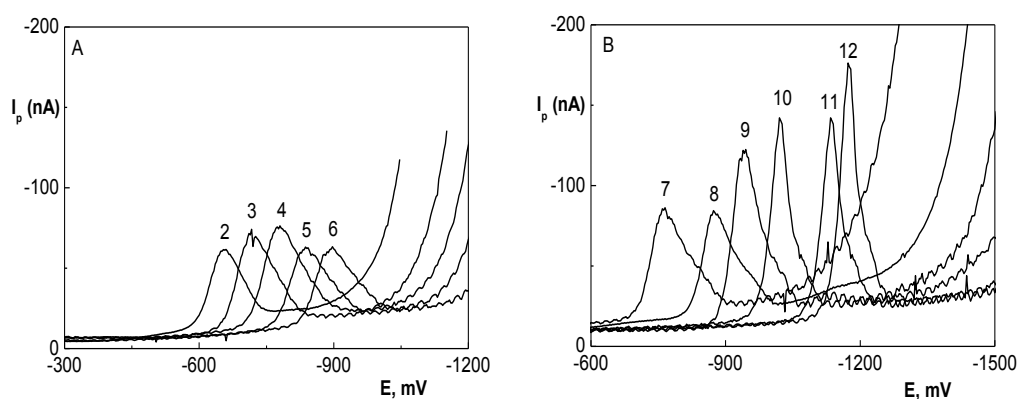
Kalibrační závislost DZ o koncentraci $(2 - 10).10^{-5}$ a související závislost I_p na koncentraci jsou zobrazeny na Obr. 3.2.8 a Obr. 3.2.9.

Kalibrační závislost DZ o koncentraci $(2 - 10).10^{-6}$ a související závislost I_p na koncentraci jsou zobrazeny na Obr. 3.2.10 a Obr. 3.2.11. Nižší koncentrace nebyly měřeny kvůli obtížnému vyhodnocení DP voltametrické vlny DZ při nízkých koncentracích.

Mez stanovitelnosti byla stanovena z opakovaných měření při koncentraci $1.10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a zobrazena na Obr. 3.2.12. Relativní směrodatná odchylka z těchto měření byla 33%, čemuž odpovídá mez stanovitelnosti $1.10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Parametry kalibrační přímky pro stanovení DZ metodou DPV m-AgSAE v prostředí 0,1 mol.l^{-1} NaOH a methanolu (9:1) jsou shrnuty v Tab 3.2.2.

Metodou standardního přídatku byla stanovena koncentrace DZ v tabletě (2 mg) technikou DPV v prostředí 0,1 mol.l^{-1} NaOH a methanolu (9:1) a dále v prostředí 0,1 mol.l^{-1} NaOH a pitné vody (9:1). Vypočítaná koncentrace DZ v léčivu po rozpuštění ve 250 ml methanolu byla v $2,81.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Na Obr. 3.2.13 a 3.2.14 jsou zobrazeny DP voltamogramy DZ a metoda standardního přídatku v prostředí pitné vody a methanolu (9:1) o pH^a 7,2. Koncentrace DZ v prostředí 0,1 mol.l^{-1} NaOH a pitné vody (9:1) byla stanovena $1,85.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Na Obr. 3.2.15 a 3.2.16 jsou zobrazeny DP voltamogramy DZ a metoda standardního přídatku v prostředí 0,1 mol.l^{-1} NaOH a methanolu (9:1). Koncentrace DZ v prostředí 0,1 mol.l^{-1} NaOH a methanolu (9:1) byla stanovena $1,65.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Získané výsledky jsou shrnuty v Tab. 3.2.3.

Bylo měřeno společné stanovení DZ ($c = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) a NDZ ($c = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) v prostředí směsi 0,1 mol.l⁻¹ a methanolu (9:1). Regenerace elektrody byly prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV. Tyto dvě látky lze stanovit vedle sebe, což je patrné z Obr. 3.2.17.



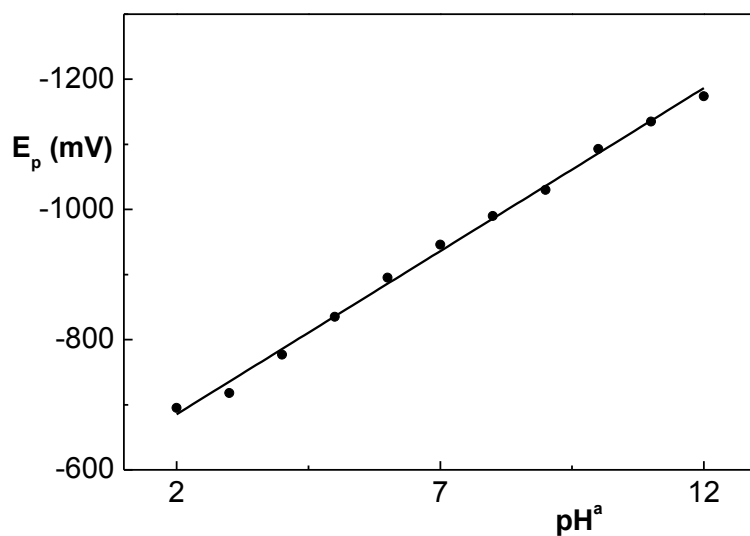
Obr. 3.2.1

DP voltamogramy DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1), měření byla prováděna bez regenerace elektrody. Čísla nad voltamogramy odpovídají danému pH roztoku při různých pH.

Tab. 3.2.1

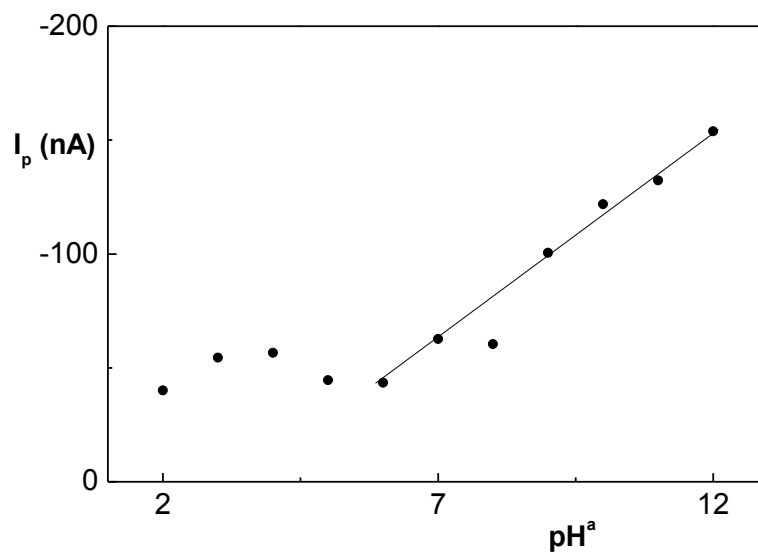
Hodnoty E_p a I_p roztoku DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v prostředí o různých pH^a byly měřeny na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) při různých měřeních.

Prostředí	pH^a	E_p (mV)	I_p (nA)
směs BR pufru $\text{pH } 2,0$ a methanolu (9:1)	2,1	-695	-40,07
směs BR pufru $\text{pH } 3,0$ a methanolu (9:1)	3,2	-718	-54,48
směs BR pufru $\text{pH } 4,0$ a methanolu (9:1)	4,2	-777	-56,58
směs BR pufru $\text{pH } 5,0$ a methanolu (9:1)	5,1	-835	-44,62
směs BR pufru $\text{pH } 6,0$ a methanolu (9:1)	6,2	-895	-43,41
směs BR pufru $\text{pH } 7,0$ a methanolu (9:1)	7,2	-946	-62,67
směs BR pufru $\text{pH } 8,0$ a methanolu (9:1)	8,3	-990	-60,67
směs BR pufru $\text{pH } 9,0$ a methanolu (9:1)	9,3	-1030	-100,5
směs BR pufru $\text{pH } 10,0$ a methanolu (9:1)	10,1	-1093	-121,8
směs BR pufru $\text{pH } 11,0$ a methanolu (9:1)	11,1	-1135	-132,3
směs BR pufru $\text{pH } 12,0$ a methanolu (9:1)	12,0	-1174	-153,9
Roztok NaOH ($0,01 \text{ mol.l}^{-1}$) o $\text{pH } 12$ a methanolu (9:1)	12	-1200	-147,6
Roztok NaOH ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$) o $\text{pH } 13,1$ a methanolu (9:1)	13,2	-1218	-155,1



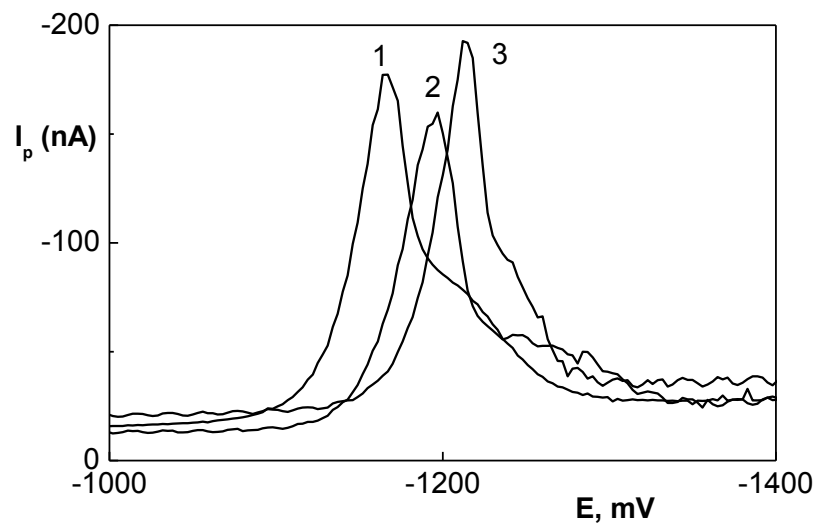
Obr. 3.2.2

Závislost potenciálu vlny E_p DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^a roztoku byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0.



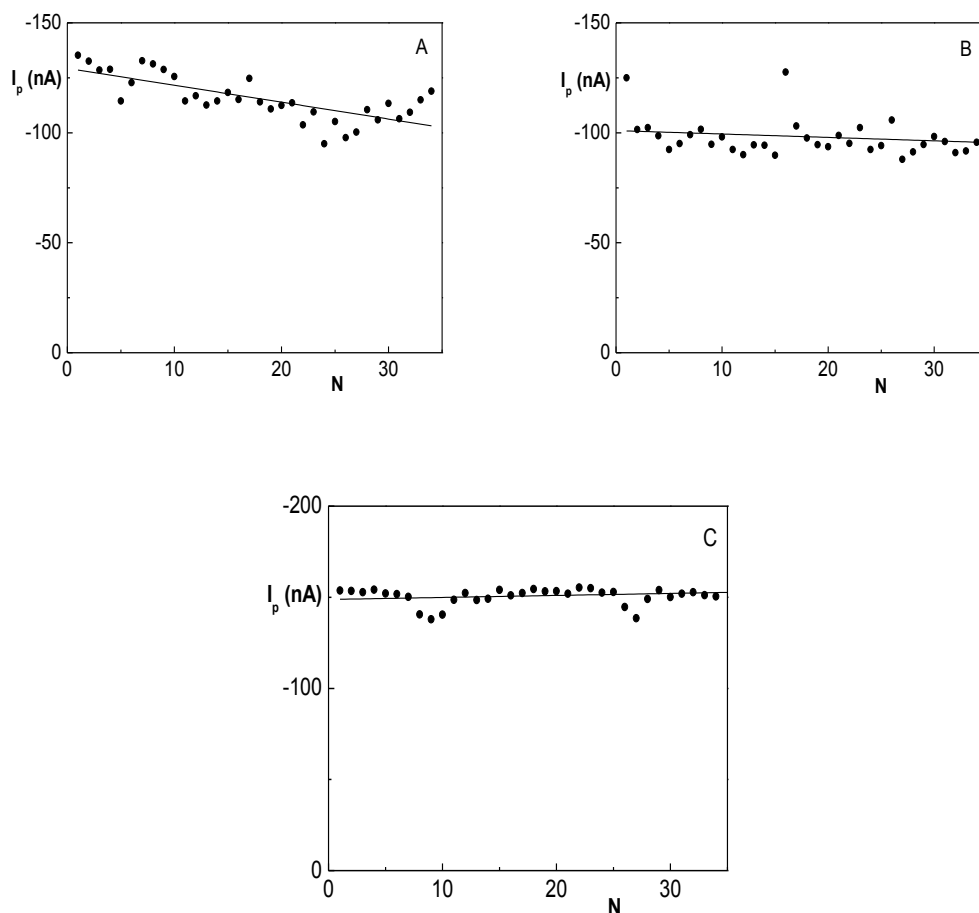
Obr. 3.2.3

Závislost proudu vlny I_p DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^a roztoku byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0.



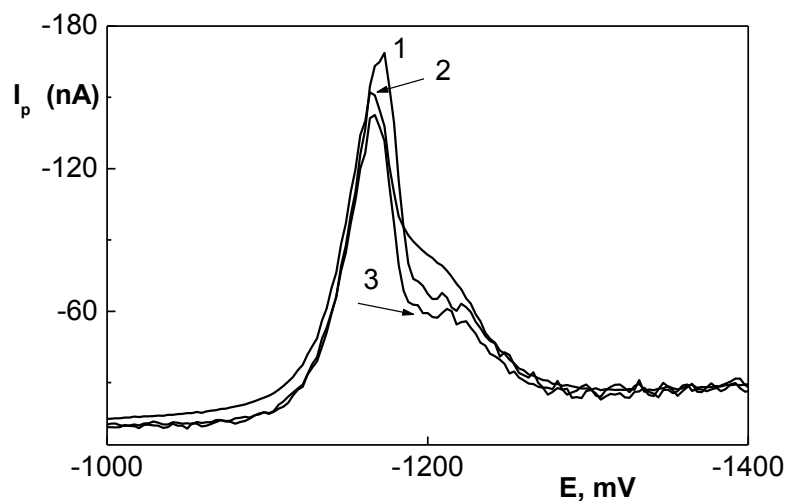
Obr. 3.2.4

DP voltamogramy DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a 12,0 (1); $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) (2); $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) (3).



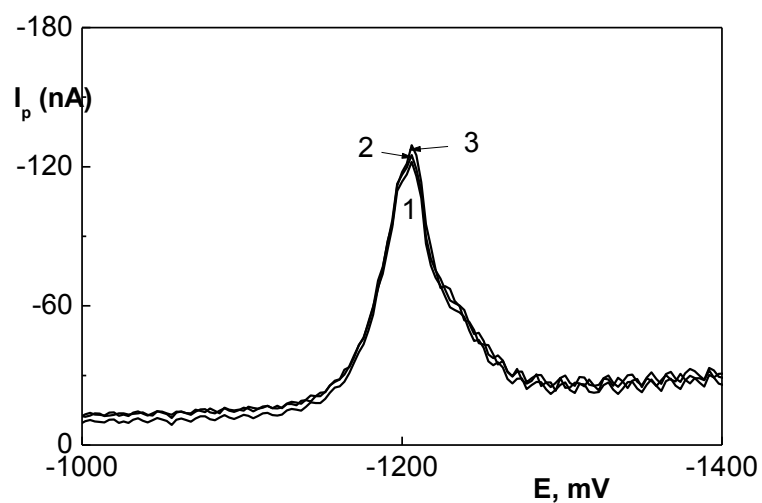
Obr. 3.2.5

Závislost stability signálu DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na opakovaném měření byla měřena metodou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 12,0 (A) (RSD 8,9% pro 34 měření), $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) (RSD 8,6% pro 34 měření), $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) s vkládanými regeneračními pulzy (C) (RSD 2,4% pro 34 měření). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.



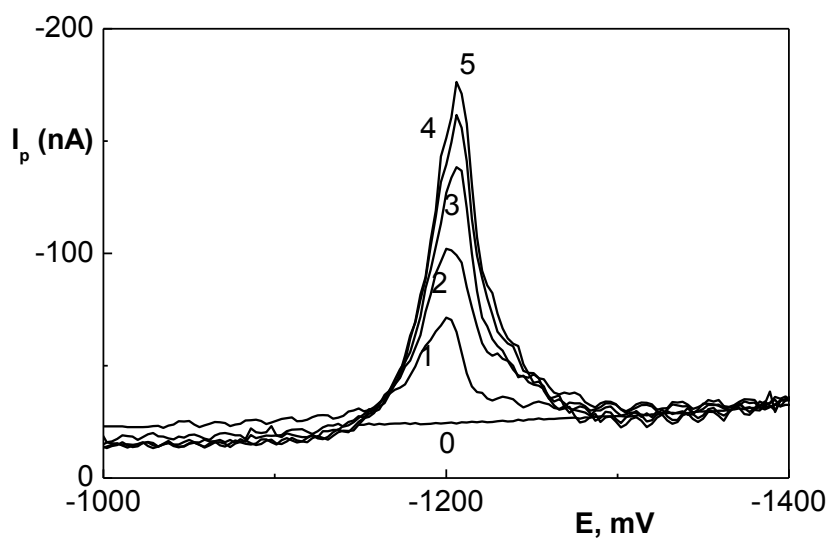
Obr. 3.2.6

DP voltamogramy DZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 12,0. Pořadové číslo měření: 1; 20 (2); 30 (3). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.



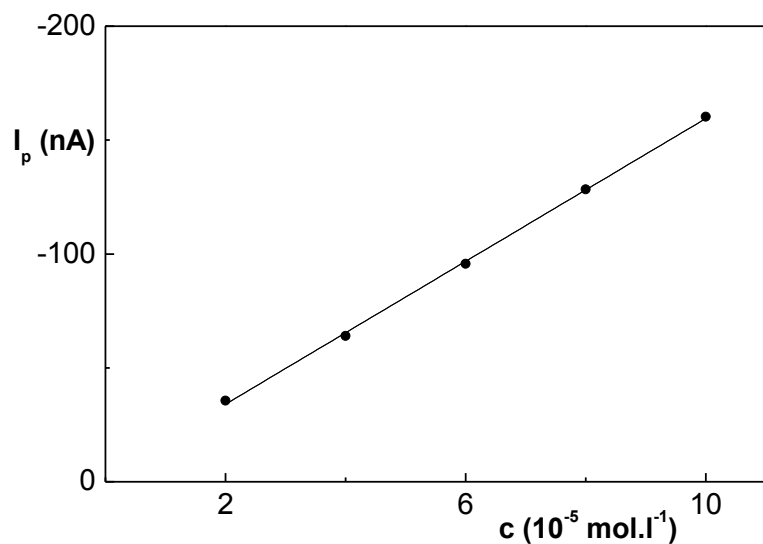
Obr. 3.2.7

DP voltamogramy DZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$ a methanolu (9:1) o pH^a 13,2. Pořadové číslo měření: 1; 20 (2); 30 (3). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.



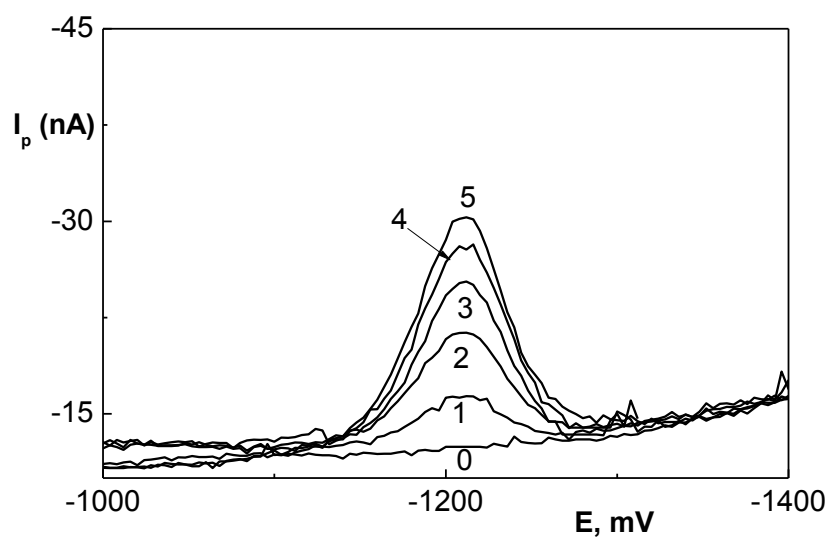
Obr. 3.2.8

DP voltamogramy DZ byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1). Koncentrace (DZ): 0 (0); $2 \cdot 10^{-5}$ (1); $4 \cdot 10^{-5}$ (2); $6 \cdot 10^{-5}$ (3); $8 \cdot 10^{-5}$ (4); $10 \cdot 10^{-5}$ (5) mol.l^{-1} . Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.



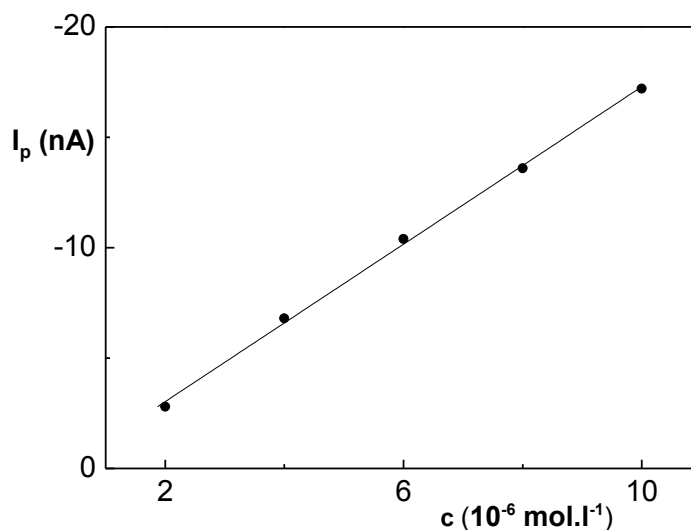
Obr. 3.2.9

Závislost proudu vlny I_p na koncentraci DZ v rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 10 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.



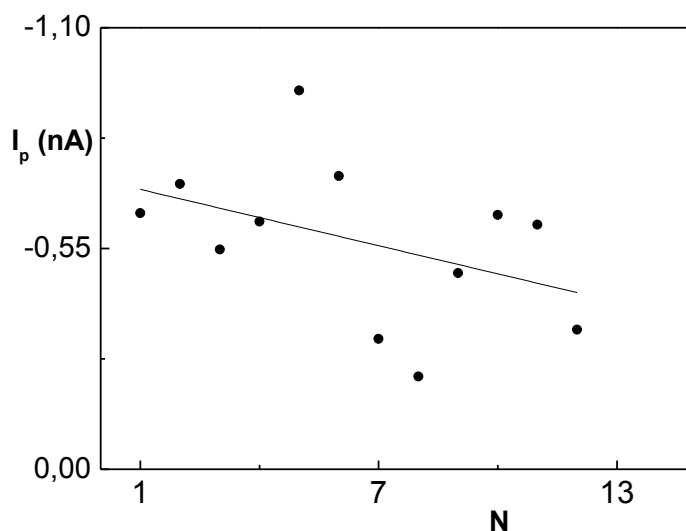
Obr. 3.2.10

DP voltamogramy DZ byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1). Koncentrace (DZ): 0 (0); $2 \cdot 10^{-6}$ (1); $4 \cdot 10^{-6}$ (2); $6 \cdot 10^{-6}$ (3); $8 \cdot 10^{-6}$ (4); $10 \cdot 10^{-6}$ (5) mol.l^{-1} . Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.



Obr. 3. 2.11

Závislost proudu vlny I_p na koncentraci DZ v rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 10 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.



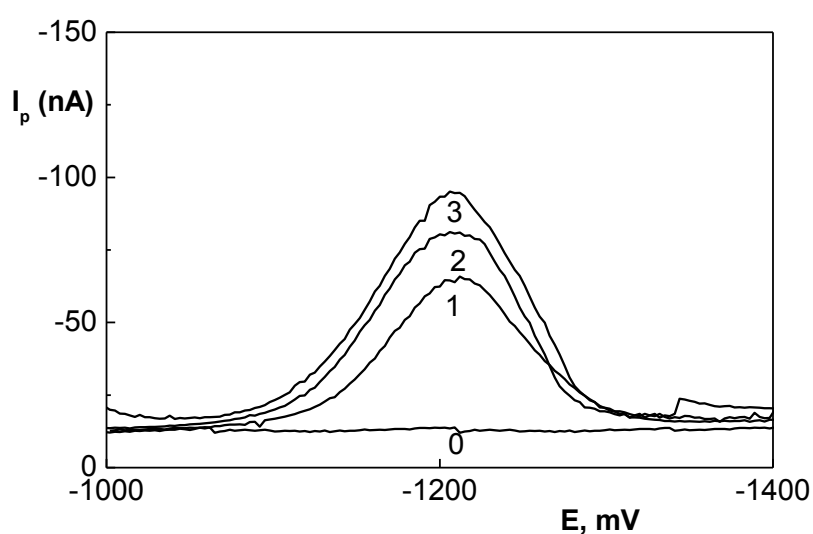
Obr. 3.2.12

I_p DZ při opakovaných měřeních byl měřen technikou DPV na m-AgSAE v prostředí $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1). Byla měřena koncentrace (DZ) $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ (RSD 33% pro 12 měření). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.

Tab. 3.2.2

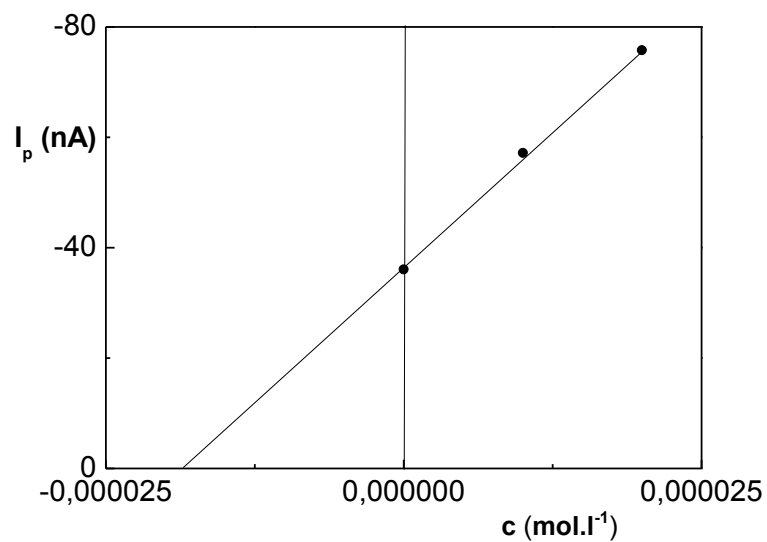
Parametry kalibrační přímky pro stanovení DZ metodou DPV m-AgSAE v prostředí 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a methanolu (9:1). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.

c [mol.l ⁻¹]	Směrnice [nA.mol ⁻¹ .l]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	LOQ [mol.l ⁻¹]
(2-10).10 ⁻⁵	0,667.10 ⁷	-1,56	0,9958	.
(2-10).10 ⁻⁶	-0,3.10 ⁷	-0,56	0,9993	1.10 ⁻⁶



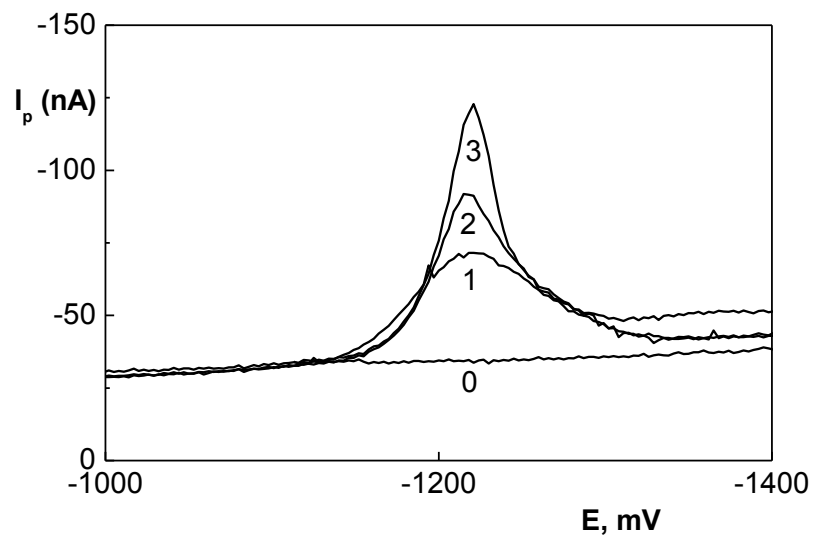
Obr. 3.2.13

DP voltamogramy DZ byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a pitné vody (9:1). Tento vzorek byl změřen pomocí metody standardního přídávku: 0,1 mol.l⁻¹ NaOH (0); 0 μ l (1); 100 μ l (2); 200 μ l (3) DZ ($c = 1.10^{-3}$ mol.l⁻¹). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.



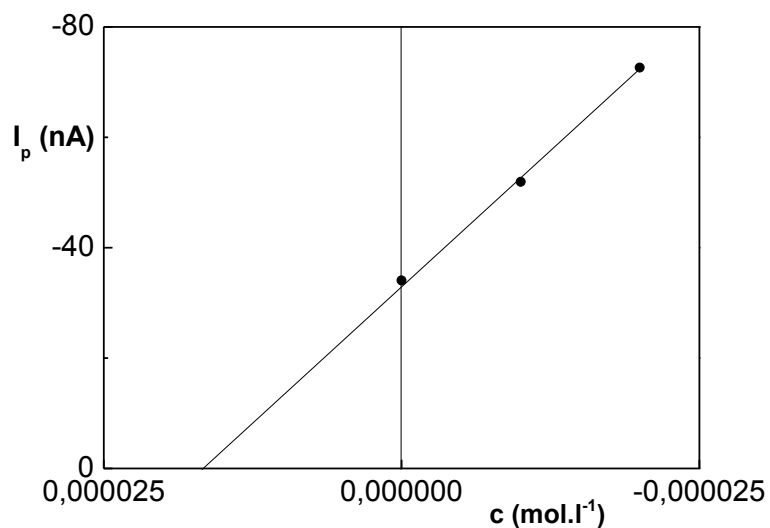
Obr. 3.2.14

Závislost proudu vlny I_p na koncentraci DZ byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí 0,1 mol.l⁻¹ a pitné vody (9:1). Tento vzorek byl změřen pomocí metody standardního přídavku: 0 μ l (1); 100 μ l (2); 200 μ l (3) DZ ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.



Obr. 3.2.15

DP voltamogramy DZ byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1). Tento vzorek byl změřen pomocí metody standardního přídávku: $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH (0); $0 \mu\text{l}$ (1); $100 \mu\text{l}$ (2); $200 \mu\text{l}$ (3) DZ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV .



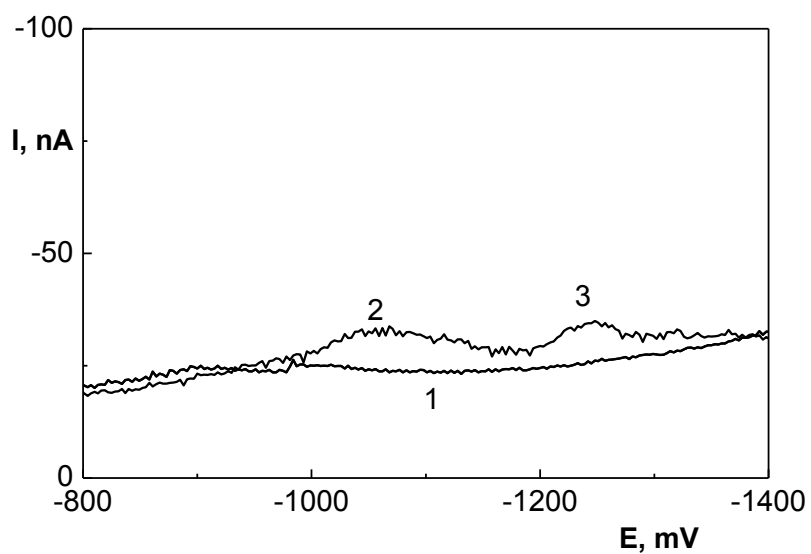
Obr. 3.2.16

Závislost proudu vlny I_p na koncentraci DZ měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a methanolu (9:1). Tento vzorek byl změřen pomocí metody standardního přídávku: 0 μ l (1); 100 μ l (2); 200 μ l (3)

DZ ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.

Tab. 3.2.3 Stanovení DZ ve vzorku léčiva metodou DPV na m-AgSAE metodou standardního přídávku v 0,1 mol.l⁻¹ a pitné vody (9:1) a v prostředí 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a methanolu (9:1).

Látka	Prostředí (9:1)	Teoretická koncentrace (mol.l ⁻¹)	Změřené koncentrace (mol.l ⁻¹)	Výtěžek (%)
Diazepam (2 mg)	NaOH+ methanol	$2,8 \cdot 10^{-5}$ mol.l ⁻¹	$1,66 \cdot 10^{-5}$	59,3
	NaOH + Pitná voda		$1,88 \cdot 10^{-5}$	67,1



Obr. 3.2.17

DP voltamogramy DZ ($c = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) a NDZ ($c = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1). Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ (1), koncentrace $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ DZ (2), $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ NDZ (3). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV.

3.3 Voltametrické stanovení nordiazepamu na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě pomocí metody DC voltametrie

Ke zjištění závislosti intenzity signálu NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na velikosti pH^a ve směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0 byla použita technika DCV. Látka v této oblasti pH^a poskytovala jeden signál. Velikost pH^a směsi vodně-methanolického roztoku se nelišila výrazně od pH vodného roztoku. Pro lepší přehled jsou naměřené voltametrické křivky znázorněny na Obr 3.3.1.

Metodou lineární regrese byla prokázána lineární závislost intenzity signálu NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na velikosti pH^a ve směsi BR pufru a methanolu (9:1). Touto metodou byl vypočten vztah pro závislost potenciálu píku E_p na pH^a roztoku v rozsahu pH^a 2,1 – 12,0:

$$E_p(\text{mV}) = -49,081 \text{ pH}^a - 579,427 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9956)$$

Jako optimální prostředí z rozmezí hodnot pH^a 2,1 – 12,0 bylo vybráno prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1.

Hodnoty E_p a I_p pro měřená pH^a roztoku jsou shrnuty do Tab. 3.3.1 a jejich závislosti vyneseny do Obr. 3.3.2 a Obr. 3.3.3.

Závislost stability signálu NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na opakovaném měření v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1 jsou zobrazeny na Obr. 3.3.4. Z tohoto obrázku je patrný pokles signálu (RSD 6,6% pro 34 měření).

Koncentrační závislost NDZ byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1 s vkládanými regeneračními pulzy. Byly měřeny následující koncentrační rozsahy v rozmezí

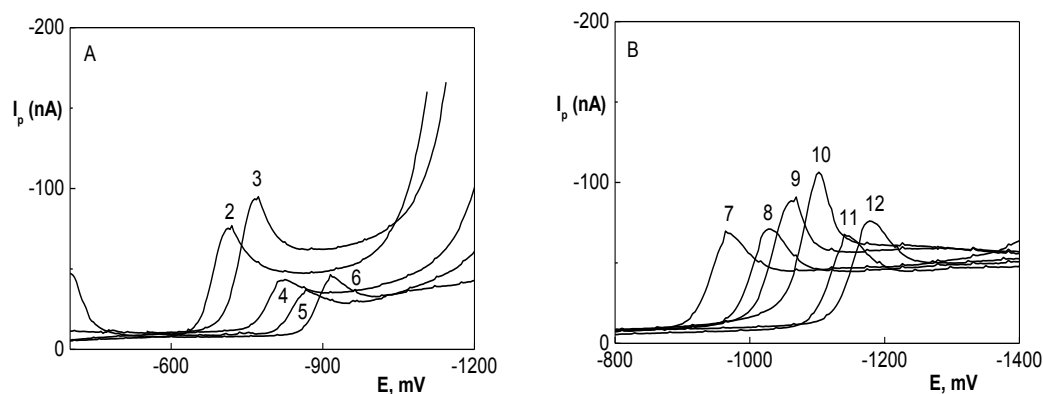
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$ a $(4 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Nižší koncentrace nebyly měřeny kvůli obtížnému vyhodnocení DC voltametrické vlny NDZ při nízkých koncentracích.

Koncentrační závislost NDZ o koncentraci $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a související závislost I_p na koncentraci NDZ byly vyneseny do Obr. 3.3.5 a Obr. 3.3.6.

Koncentrační závislost NDZ o koncentraci $(4 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a související závislost I_p na koncentraci NDZ byly vyneseny do Obr. 3.3.7 a Obr. 3.3.8.

Mez stanovitelnosti byla stanovena z opakovaných měření při $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a zobrazena na Obr. 3.3.9. Relativní směrodatná odchylka z těchto měření byla 9,9%, čemuž odpovídá mez stanovitelnosti $5,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$.

Parametry kalibrační přímky pro stanovení NDZ metodou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a 10,1 jsou shrnuty v Tab. 3.3.2.



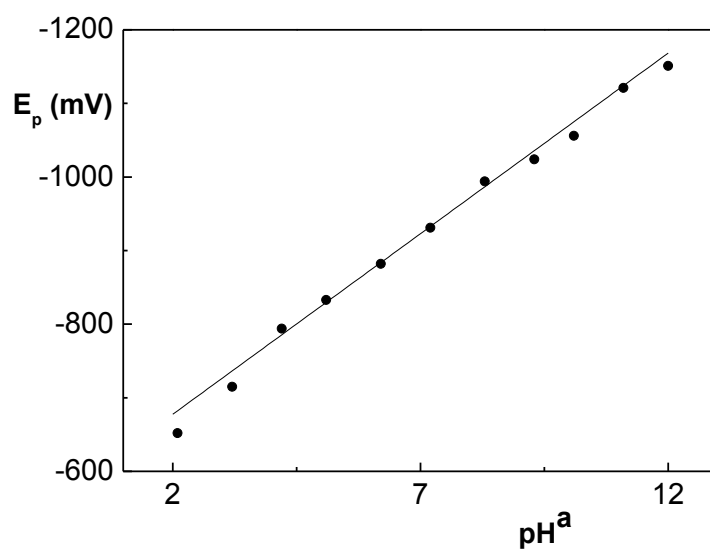
Obr. 3.3.1

DC voltamogramy NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) byly měřeny technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1). Číslo nad voltamogramy odpovídá pH roztoku při různých pH.

Tab. 3.3.1

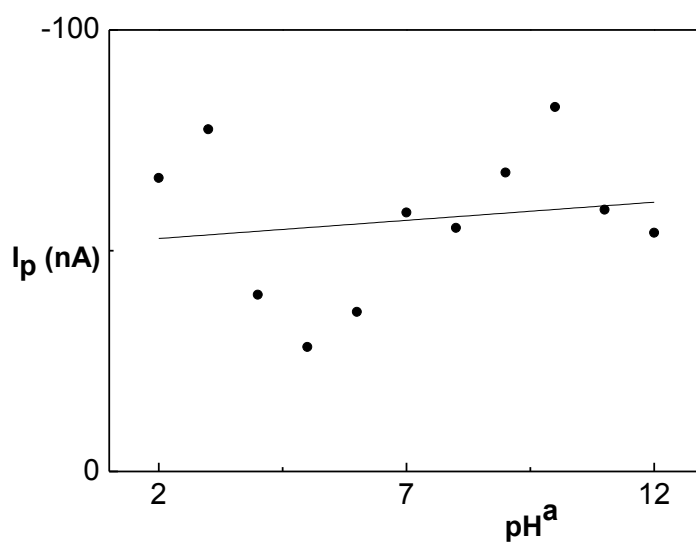
Hodnoty E_p a I_p roztoku NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) byly měřeny v prostředích o různých pH^a měřené na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) při různých měřeních.

Prostředí	pH ^a	E_p (mV)	I_p (nA)
směs BR pufru pH 2,0 a methanolu (9:1)	2,1	-652	-66,5
směs BR pufru pH 3,0 a methanolu (9:1)	3,2	-715	-77,48
směs BR pufru pH 4,0 a methanolu (9:1)	4,2	-794	-40
směs BR pufru pH 5,0 a methanolu (9:1)	5,1	-833	-28,2
směs BR pufru pH 6,0 a methanolu (9:1)	6,2	-882	-36,2
směs BR pufru pH 7,0 a methanolu (9:1)	7,2	-931	-58,65
směs BR pufru pH 8,0 a methanolu (9:1)	8,3	-994	-55,14
směs BR pufru pH 9,0 a methanolu (9:1)	9,3	-1024	-67,67
směs BR pufru pH 10,0 a methanolu (9:1)	10,1	-1076	-85,24
směs BR pufru pH 11,0 a methanolu (9:1)	11,1	-1124	-59,29
směs BR pufru pH 12,0 a methanolu (9:1)	12,0	-1151	-54,04



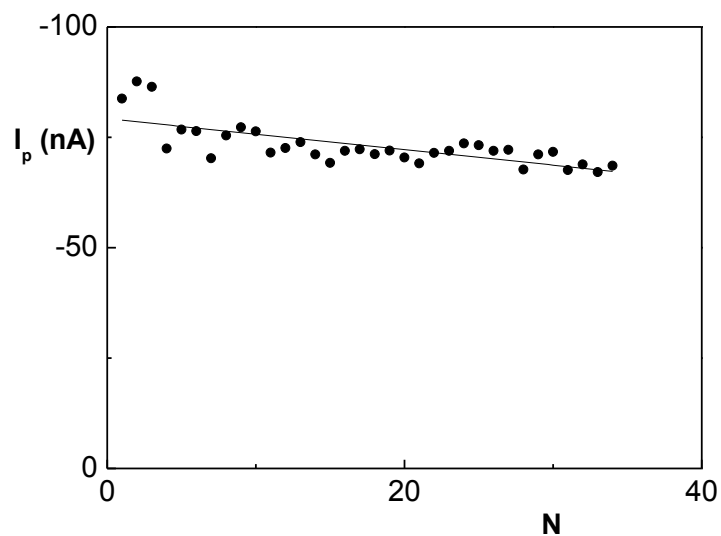
Obr. 3.3.2

Závislost potenciálu vlny E_p NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^a roztoku byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0.



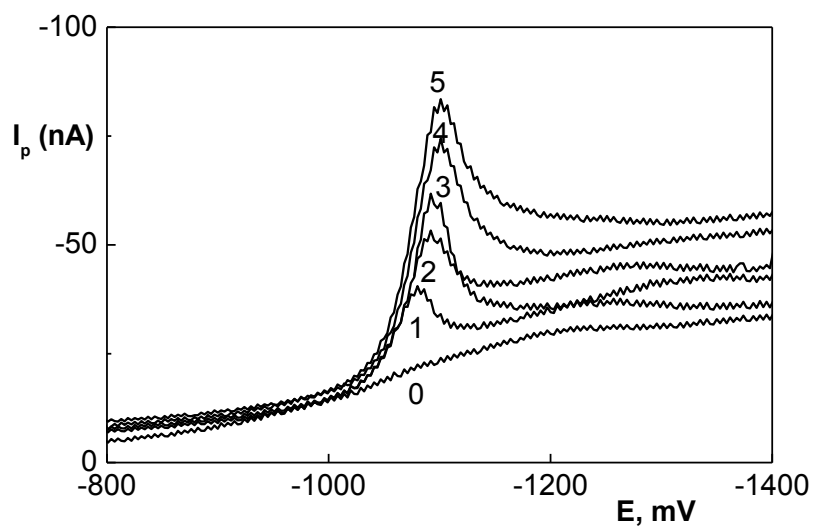
Obr. 3.3.3

Závislost proudu vlny I_p NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^a roztoku byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0.



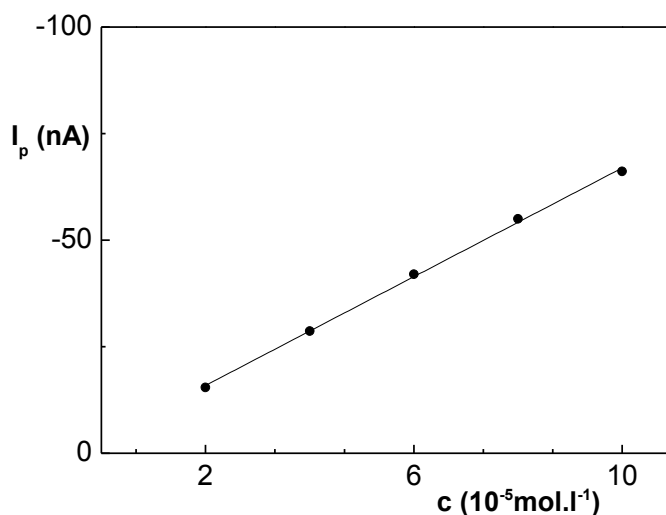
Obr. 3.3.4

Závislost stability signálu NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na opakovaném měření byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1 (RSD 6,6% pro 34 měření). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV.



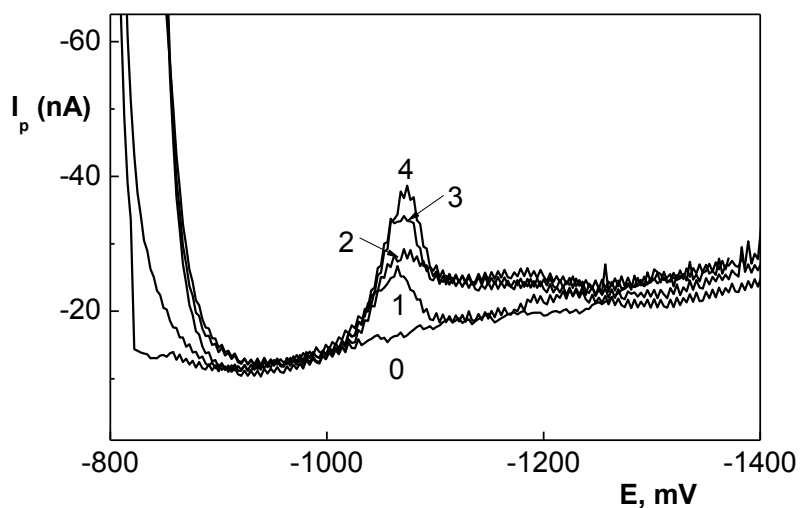
Obr. 3.3.5

DC voltamogramy NDZ byly měřeny technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Koncentrace (NDZ): 0 (0); $2 \cdot 10^{-5}$ (1); $4 \cdot 10^{-5}$ (2); $6 \cdot 10^{-5}$ (3); $8 \cdot 10^{-5}$ (4); $10 \cdot 10^{-5}$ (5) mol.l^{-1} . Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV.



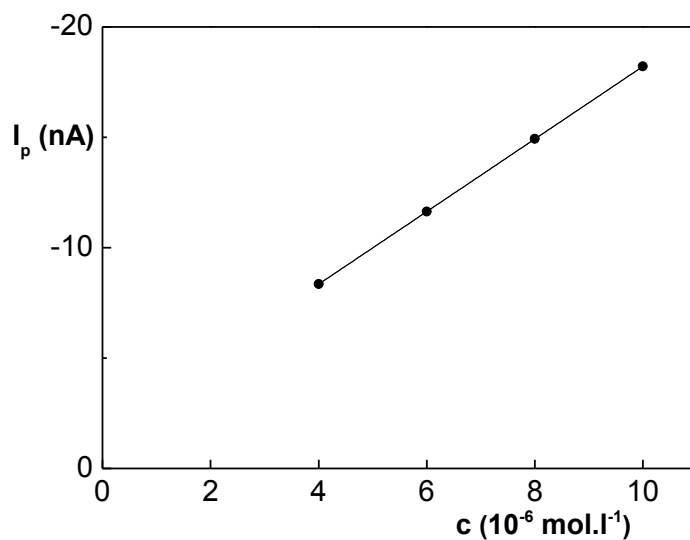
Obr. 3.3.6

Závislost proudu píku I_p na koncentraci NDZ v rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 10 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Regenerace elektrody byly prováděny při potenciálech -800 až -1400 mV.



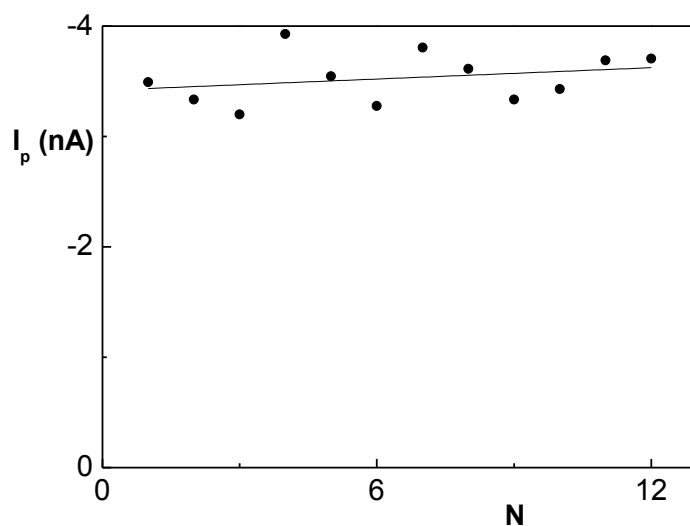
Obr. 3.3.7

DC voltamogramy NDZ byly měřeny technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Koncentrace (NDZ): 0 (0); $4 \cdot 10^{-5}$ (1); $6 \cdot 10^{-5}$ (2); $8 \cdot 10^{-5}$ (3); $10 \cdot 10^{-5}$ (4) mol.l^{-1} . Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV.



Obr. 3.3.8

Závislost proudu píku I_p na koncentraci NDZ v rozmezí $4 \cdot 10^{-6} - 10 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV.



Obr. 3.3.9

I_p NDZ při opakovaných měřeních byl měřen technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru o pH^a o hodnotě 10,1. Měřená koncentrace (NDZ) byla $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$.

Tab. 3.3.2

Parametry kalibrační přímky pro stanovení NDZ metodou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV.

c [mol.l ⁻¹]	Směrnice [nA.mol ⁻¹ .l]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	LOQ [mol.l ⁻¹]
(4-10).10 ⁻⁵	-0,64.10 ⁷	-1,772	0,9984	-
(4-10).10 ⁻⁶	-0,558.10 ⁷	-1,664	0,998	5,5.10 ⁻⁶

3.4 Voltametrické stanovení nordiazepamu na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě pomocí DP voltametrie

Ke zjištění závislosti intenzity signálu NDZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na velikosti pH^a ve směsi BR pufru v rozmezí pH^a hodnotách 2,1 – 12,0 a methanolu (9:1) byla použita technika DPV. Látka v této oblasti pH^a poskytovala jeden signál. Velikost pH^a směsi vodně-methanolického roztoku se nelišila výrazně od pH vodného roztoku. Pro lepší přehled jsou naměřené voltametrické křivky znázorněny na Obr. 3.4.1.

Metodou lineární regrese byla prokázána lineární závislost intenzity signálu NDZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na velikosti pH^a ve směsi BR pufru a methanolu (9:1). Touto metodou byl vypočten vztah pro závislost potenciálu píku E_p na pH^a roztoku v rozsahu pH^a 2,1 – 12,0:

$$E_p(\text{mV}) = -47,273 \text{ pH}^a - 640,91 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9988)$$

Jako optimální prostředí z rozmezí hodnot pH^a 2,1 – 12,0 bylo vybráno prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1.

Hodnoty E_p a I_p pro měřená pH^a roztoku jsou shrnuty do v Tab. 3.4.1 a jejich závislosti vyneseny do Obr. 3.4.2 a Obr. 3.4.3.

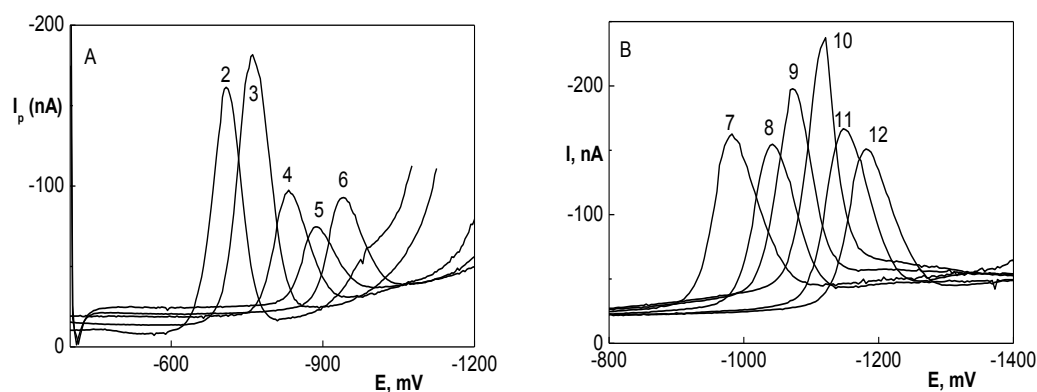
Závislost stability signálu NDZ na opakovaném měření v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1 je zobrazena na Obr. 3.4.4. Z tohoto obrázku je patrná stabilita signálu (RSD 3% pro 34 měření).

Koncentrační závislost NDZ byla měřena pomocí techniky DPV na m-AgSAE v prostředí v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Byly měřeny koncentrační závislosti v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-5}$ a $(2 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Nižší koncentrace nebyly měřeny kvůli obtížnému vyhodnocení DP voltametrické vlny NDZ při nízkých koncentracích.

Koncentrační závislosti NDZ o koncentraci $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a související závislost I_p na koncentraci NDZ byly vyneseny do Obr. 3.4.5 a Obr. 3.4.6. Koncentrační závislost NDZ o koncentraci $(2 - 10) \cdot 10^{-6}$ a související závislost I_p na koncentraci NDZ byly vyneseny do Obr. 3.4.7 a Obr. 3.4.8.

Mez stanovitelnosti byla stanovena z opakovaných měření při koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a zobrazena na Obr. 4.18. Relativní směrodatná odchylka z těchto měření byla 8,8%, čemuž odpovídá mez stanovitelnosti $1,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Nižší koncentrace nebyly měřeny.

Parametry kalibrační přímky pro stanovení NDZ metodou DCV m-AgSAE v prostředí BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a 10,1 jsou shrnuty do Tab. 3.4.2.



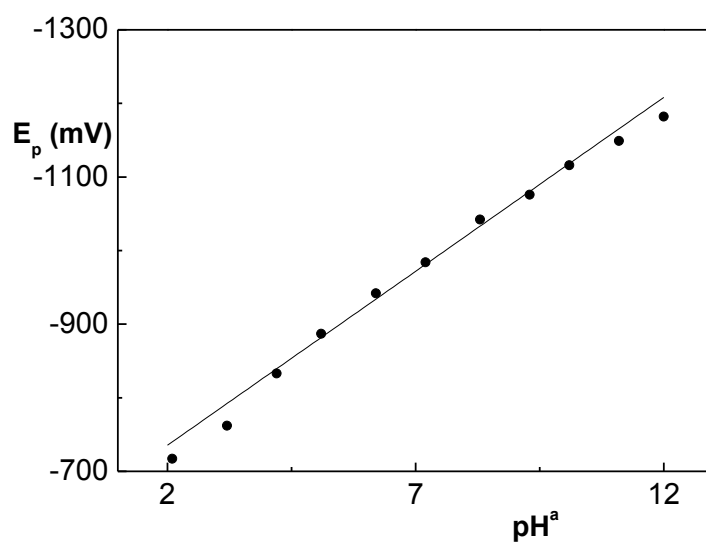
Obr. 3.4.1

DP voltamogramy NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1). Čísla nad voltamogramy odpovídají pH roztoku při různých pH.

Tab. 3.4.1

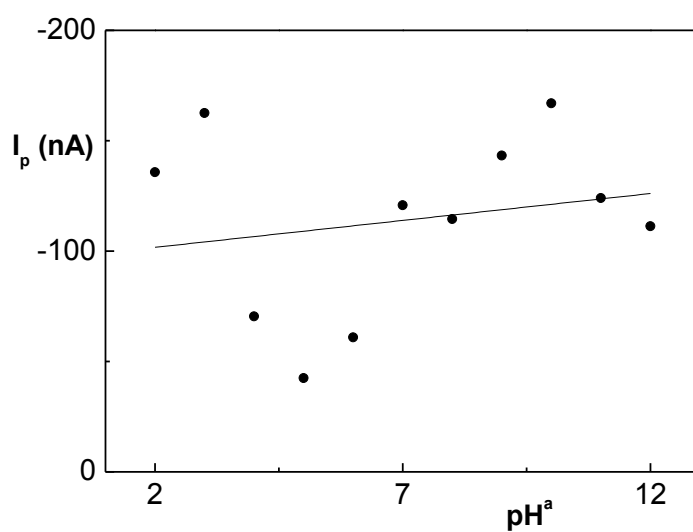
Hodnoty E_p a I_p roztoku NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v prostředích o různých pH^a měřené na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) při různých měřeních.

Prostředí	pH^a	E_p (mV)	I_p (nA)
směs BR pufru pH 2,0 a methanolu (9:1)	2,1	-717	-135,7
směs BR pufru pH 3,0 a methanolu (9:1)	3,2	-762	-164,5
směs BR pufru pH 4,0 a methanolu (9:1)	4,2	-833	-70,46
směs BR pufru pH 5,0 a methanolu (9:1)	5,1	-942	-42,48
směs BR pufru pH 6,0 a methanolu (9:1)	6,2	-984	-60,96
směs BR pufru pH 7,0 a methanolu (9:1)	7,2	-931	-120,8
směs BR pufru pH 8,0 a methanolu (9:1)	8,3	-1042	-114,5
směs BR pufru pH 9,0 a methanolu (9:1)	9,3	-1076	-143,5
směs BR pufru pH 10,0 a methanolu (9:1)	10,1	-1096	-166,9
směs BR pufru pH 11,0 a methanolu (9:1)	11,1	-1139	-124
směs BR pufru pH 12,0 a methanolu (9:1)	12,0	-1182	-111,2



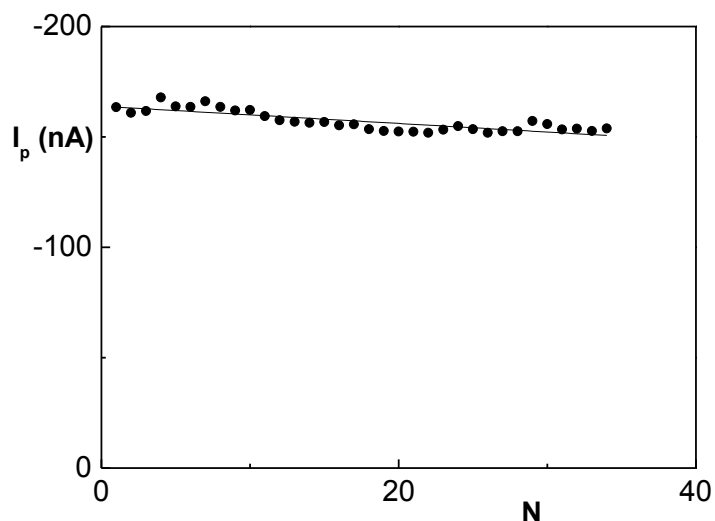
Obr. 3.4.2

Závislost potenciálu vlny E_p NDZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^a roztoku byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0.



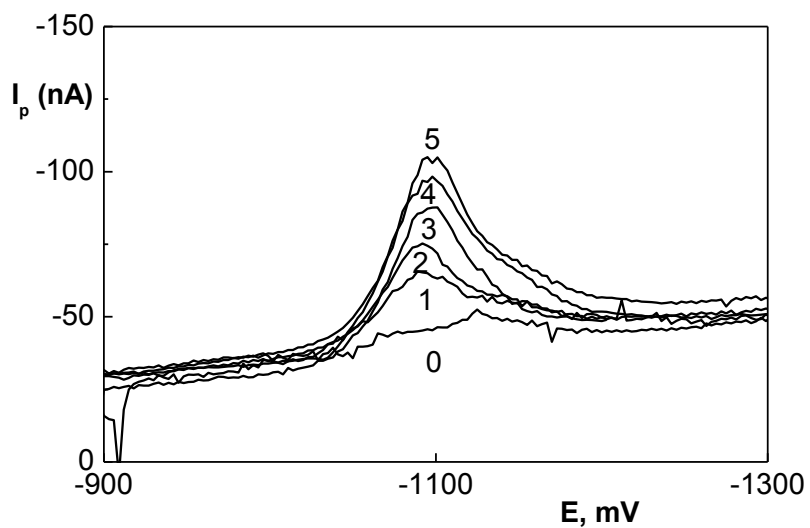
Obr. 3.4.3

Závislost proudu vlny I_p NDZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^a roztoku byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0.



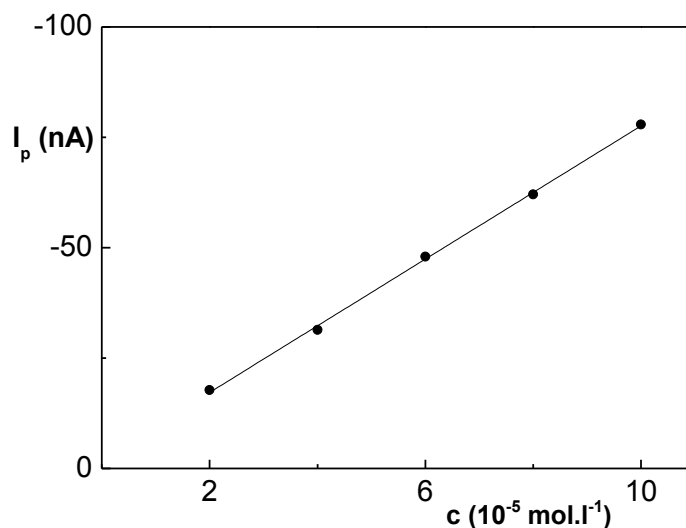
Obr. 3.4.4

Závislost stability signálu NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na opakovaném měření byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. (RSD z 3% pro 34 měření). Regenerace byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV.



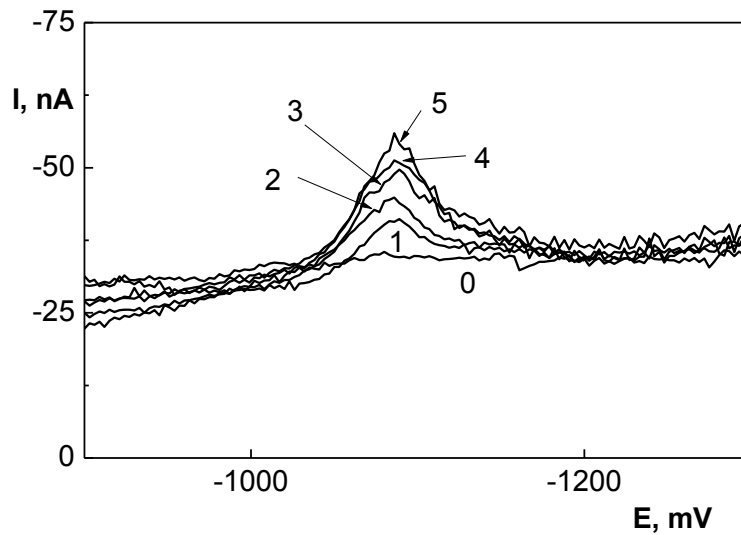
Obr. 3.4.5

DP voltamogramy NDZ byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu o pH^a o hodnotě 10,1. Koncentrace (NDZ): 0 (0); $2 \cdot 10^{-5}$ (1); $4 \cdot 10^{-5}$ (2); $6 \cdot 10^{-5}$ (3); $8 \cdot 10^{-5}$ (4); $10 \cdot 10^{-5}$ (5) mol.l^{-1} .



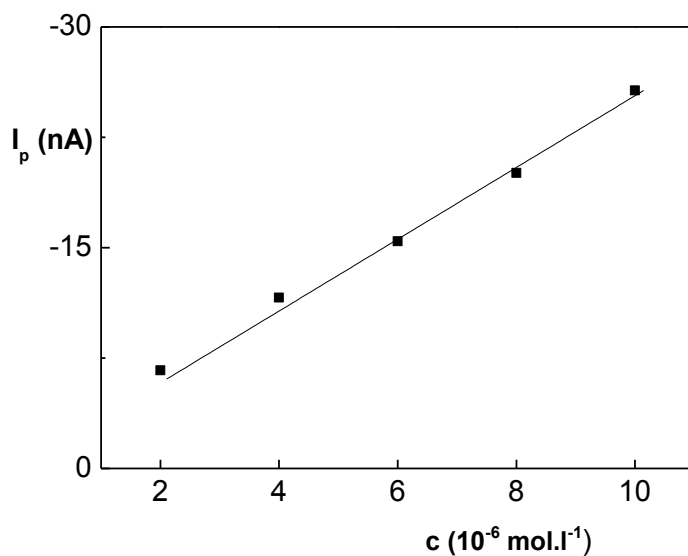
Obr. 3.4.6

Závislost proudu vlny I_p na koncentraci NDZ v rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 10 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu o pH^a o hodnotě 10,1



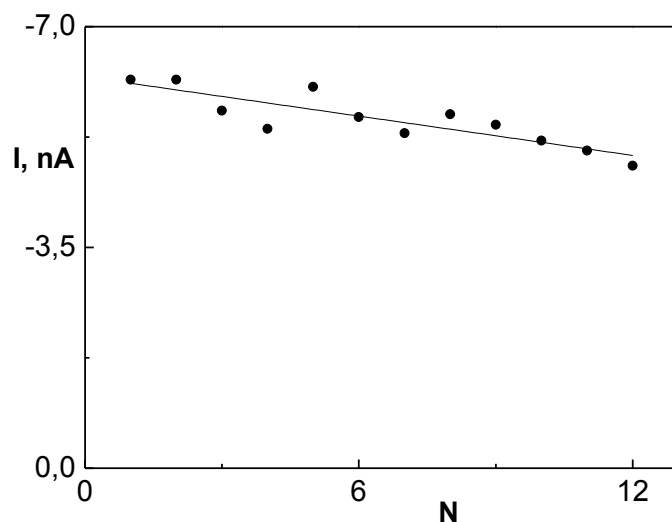
Obr. 3.4.7

DP voltamogramy NDZ byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Koncentrace (NDZ): 0 (0); $2 \cdot 10^{-6}$ (1); $4 \cdot 10^{-6}$ (2); $6 \cdot 10^{-6}$ (3); $8 \cdot 10^{-6}$ (4); $10 \cdot 10^{-6}$ (5) mol.l^{-1} .



Obr. 3.4.8

Závislost proudu píku I_p na koncentraci NDZ v rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 10 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ byla měřena technikou DpV na m-AgSAE v BR pufru a methanolu o pH^a o hodnotě 10,1.



Obr. 3.4.9

I_p NDZ při opakovaných měřeních byl měřen technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a 10,1. Měřená koncentrace NDZ byla $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$.

Tab. 3.4.2

Parametry kalibrační přímky pro stanovení NDZ metodou DCV m-AgSAE v prostředí BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a 10,1. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV.

c [mol.l ⁻¹]	Směrnice [nA.mol ⁻¹ .l]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	LOQ [mol.l ⁻¹]
(2-10).10 ⁻⁵	-0,752.10 ⁻⁷	-0,75	0,9963	-
(2-10).10 ⁻⁶	-0,428.10 ⁻⁷	-0,81	0,9981	1,7.10 ⁻⁶

4. Závěr

1. Byly vypracovány metody stanovení DZ:

- Technikou DCV na m-AgSAE v koncentračním rozsahu $10 \cdot 10^{-5} - 6 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ v prostředí směsi 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a methanolu (9:1). Mez stanovitelnosti byla stanovena $6,6 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹.
- Technikou DPV na m-AgSAE v koncentračním rozsahu $10 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ v prostředí směsi 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a methanolu (9:1). Mez stanovitelnosti byla stanovena $1 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹.

2. Byly vypracovány metody pro stanovení NDZ:

- Technikou DCV na m-AgSAE v koncentračním rozsahu $10 \cdot 10^{-5} - 4 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a 10,1. Mez stanovitelnosti byla stanovena $5,5 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹.
- Technikou DPV na m-AgSAE v koncentračním rozsahu $10 \cdot 10^{-5}$ až $2 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a 10,1. Mez stanovitelnosti byla stanovena $1,7 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹.

3. Byla stanovena koncentrace DZ v léčivu:

- Koncentrace diazepamu byla stanovena pomocí metody standardního přídatku a citlivější metody DPV v prostředí směsi 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a methanolu (9:1) a v prostředí směsi 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a pitné vody (9:1) o pH^a 7,2. Dosažené výsledky jsou shrnuty v Tab. 5.1

Tab. 5.1

Výsledky analýzy DZ (2 mg) v léčivu měřené metodou DPV pomocí metody standardního přídatku v prostředí směsi 0,1 mol.l⁻¹ a methanolu (9:1) a v prostředí směsi 0,1 mol.l⁻¹ a pitné vody (9:1).

Prostředí	Teoretická koncentrace (mol.l ⁻¹)	Změřené koncentrace (mol.l ⁻¹)	Výtěžek (%)
NaOH + methanol	2,8.10 ⁻⁵	1,66.10 ⁻⁵	59,3
NaOH + pitná voda	mol.l ⁻¹	1,88.10 ⁻⁵	67,1

Nízké hodnoty výtěžnosti při analýze DZ v léčivu metodou DPV mohla být způsobena menší hmotností deklarované látky v tabletě, nebo adsorbovanými látkami na povrchu elektrody.

- Analýza léčiva NDZ nebyla prováděna. Dle zdrojů Státního ústavu pro kontrolu léčiv není toto léčivo na seznamu léčebných přípravků, a tudíž není lékaři v ČR předepisováno. V některých zemích evropské unie je výdej tohoto léčiva vázán na lékařský předpis.

5. Literatura

- [1] GERECKE, M. Structure and properties of midazolam compared with other benzodiazepins. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1991, vol. 38, p. 154–171.
- [2] VARDANYAN, R., HRUBY, V. *Synthesis of Essential Drugs*. 1st ed. 2006. ISBN 978-0444521668.
- [3] EAGLESON, M. *Concise Encyclopedia Chemistry*. 1st ed. 1994. ISBN 978-0899254579.
- [4] *Remedia Compendium*. 3rd ed. Praha 2: Panax, 1999. 772 p. ISBN 80-902126-5-4.
- [5] SZARA, S. I., LUDFORD, J. P. *Benzodiazepines: A review of research results*. 1981.
- [6] MUSIL, J., NOVÁKOVÁ, O., KUNZ, K. *Biochemie v obrazech a schématech*. 1st ed. Praha 1: Avicenum, 1976. 368 p.
- [7] *Principles of forensic toxicology*. LEVINE, B. (ed.). 2nd ed. 2003. ISBN 978-1890883874.
- [8] *Substance Abuse: A Comprehensive Textbook*. LOWINSON, J. H., RUIZ, P., MILLMAN, R. B., LANGROD, J. G. (Eds.). 4th ed. 2004. ISBN 978-0781734745.
- [9] PÉTURSSON, H. The benzodiazepine withdrawal syndrome and its management. *J R Coll Gen Pract*, 2006, vol. 89, p. 1455–1459. DOI: 10.1111/j.1360-0443.1994.tb03743.x.

- [10] AYD, F. J. *Lexicon of Psychiatry, Neurology, and the Neurosciences*. 1995. ISBN 978-0683002980.
- [11] SALAMONE, S. J. *Benzodiazepines and GHB: Detection and Pharmacology*. 1st ed. Humana Press, 2001. ISBN 978-0896039810.
- [12] SCHATZBERG, A. F., NEMEROFF, C. B. *Essentials of Clinical Psychopharmacology*. 2nd ed. 2006. ISBN 978-1585620173.
- [13] MARTIN, A., SCAHILL, L., CHARNEY, D. S., LECKMAN, J. F. *Pediatric Psychopharmacology: Principles and Practice*. 1st ed. 2002. ISBN 978-0195141733.
- [14] GOLDFRANK, L., FLOMENBAUM, N., LEWIN, N., HOWLAND, M. A., HOFFMAN, R., NELSON, L. *Goldfrank's toxicologic emergencies*. 7th ed. McGraw-Hill Professional, 1998. ISBN 978-0071360012.
- [15] MARLAND, A., SARKAR, P., LEAVITT, R. The Urinary Elimination Profiles of Diazepam and Its Metabolites, Nordiazepam, Temazepam, and Oxazepam, in the Equine after a 10-mg Intramuscular Dose. *J. Anal. Toxicol.*, 1999, vol. 23, p. 29–34.
- [16] DESCOTES, J. *Human Toxicology*. 1st ed. Elsevier Science, 1996. ISBN 978-0444815576.
- [17] *Benzodiazepines*. TRIMBLE, M., HINDMARCH, I. (Eds.). 1st ed. Routledge, 2001. ISBN 978-1871816433.
- [18] AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Benzodiazepine Dependence, Toxicity and Abuse*. 1990. ISBN 978-0890422281.

- [19] LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. 15th ed. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0836-1.
- [20] FOLSCH, U. R., KOCHSIEK, K., SCHMIDT, R. F. *Patologická fyziologie*. 1st ed. Praha: Grada, 2003. ISBN 08-247-0319-X.
- [21] SANTOS, M. M. C., FAMILA, V., GONCALVES, M. L. S. Copper-Psychoactive Drug Complexes: A voltammetric Approach to Compexation by 1,4-Benzodiazepines. *Anal. Biochem.*, 2002, vol. 303, p. 111–119.
- [22] CARVALHO, L. M., CORREIA, D., GARCIA, S. C., BAIRROS, A. V., NASCIMENTO, P. C., BOHRER, D. A new method for the simultaneous determination of 1,4-benzodiazepines and amfepramone as adulterants in phytotherapeutic formulations by voltammetry. *Forensic Sci Int.*, 2010, vol. 202, p. 75–81.
- [23] FISCHER, J., VANOURKOVA, L., DANHEL, A., VYSKOCIL, V., CIZEK, K., BAREK, J., PECKOVA, K., YOSYPCHUK, B., NAVRATIL, T. Voltammetric Determination of Nitrophenols at a Silver Solid Amalgam Electrode. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2007, p. 226–234.
- [24] SANTOS, M. M. C., FAMILA, V., GONCALVES, M. L. S. Square-wave voltammetric techniques for determiantion of psychoactive 1,4-benzodizapine drug. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, vol. 374, p. 1074–1081.
- [25] CHAVES, M. E. L., SANTANDER, J. M. P., AGUILERA, A. M. C., RODRÍGUEZ, R. N., DE CISNERO, J. L. H. Modified carbon-paste electrodes as sensors for the determination of 1,4-benzodiazepines: Application to the determination of diazepam and oxazepam in biological fluids. *Sens. Actuators, B*, 2006, vol. 115, p. 575–583.

- [26] RIBARSKA, J. T., JOLEVSKA, S. T., MILENKOVA, K., GORAČINOVA, K., DODOV, M. G., DIMITROVSKA, A. Simultaneous determination of diazepam and Preservatives in HPMC hydrogel by HPLC. *Bull. Chem. Technol. Macedonia*, 2005, vol. 24, p. 103–108.
- [27] GIER, J. J., THART, B. J. Sensitive determination of diazepam and N-desmethyldiazepam in plasma. *J. Chromatogr.*, 1979, vol. 163, p. 304–309.
- [28] HAWARY, W. F., ISSA, Y. M., TALAT, A. Spectrophotometric Determination of Diazepam in Pure form, Tablets and Ampoules. *Int. J. Biomed. Sci.*, 2007, vol. 3, p. 50–55.
- [29] TISCIONE, N. B., SHAN, X., ALFORD, I., YEATMAN, D. T. Quantitation of Benzodiazepines in Whole Blood by Electron Impact-Gas Chromatography– Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, 2008, vol. 32, p. 644–652.
- [30] WEINFELD, E. R., POSMANTER, H. N., KHOO, K. C., PUGLISI, C. V. Rapid determination of diazepam and nordiazepam in plasma by electron capture gas-liquid chromatography : Application in clinical pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr.*, 1977, vol. 143, p. 581–595.
- [31] HUANG, W., MOODYT, D. E., ANDRENYAK, D. M., ROLLINS, D. E. Immunoassay detection of nordiazepam, triazolam, lorazepam, and alprazolam in blood. *J. Anal. Toxicol.*, 1993, vol. 17, p. 365–369.
- [31] CABALKOVÁ, D., BAREK, J., FISCHER, J., NAVRÁTIL, T., PECKOVÁ, K., YOSYPCHUK, B. Voltametrické stanovení herbicidu bifenoxu na stříbrné pevné amalgámové elektrodě modifikovanou rtuťovým meniskem. *Chem. Listy*, 2003, vol. 103, p. 236–242.