

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Štěpánka Havlíková

Voltametrické stanovení chloramfenikolu a chlorambucilu
na amalgámových elektrodách

Voltammetric Determination of Chloramphenicol and
Chlorambucil on Amalgam Electrodes

Diplomová práce

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

Praha 2015

Tato diplomová práce vznikla v rámci Univerzitního výzkumného centra UNCE 204018/304018/2012 “Supramolekulární chemie“. Poděkování za její finanční podporu patří Grantové agentuře České republiky (projekt P206/12/G151).

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, je možné pouze po písemném souhlasu Karlovy univerzity v Praze.

V Praze dne 12.4.2015

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Fischerovi, Ph.D. za odborné vedení, všestrannou pomoc a cenné připomínky k mé diplomové práci.

Také velice děkuji svým rodičům za umožnění studia na vysoké škole a za podporu během celého studia.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá stanovením chloramfenikolu a chlorambucilu metodami diferenční pulzní voltametrie (DPV), DC voltametrie (DCV), cyklické voltametrie (CV) a adsorpční rozpouštěcí voltametrie (AdSV) na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě (m-AgSAE). V první části práce byly pro stanovení chloramfenikolu nalezeny optimální podmínky a za těchto podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti a následně určeny meze stanovitelnosti.

Sledován byl vliv pH v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru. Jako optimální prostředí pro stanovení chloramfenikolu na m-AgSAE metodou DCV bylo zvoleno pH 7 a při stanovení metodou DPV bylo zvoleno pH 8. Při těchto zvolených podmínkách byly proměřeny kalibrační závislosti v rozmezí $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Při stanovení chloramfenikolu metodou DCV bylo dosaženo meze stanovitelnosti $2,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Při stanovení chloramfenikolu metodou DPV bylo dosaženo meze stanovitelnosti $2,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v destilované vodě, $2,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v říční vodě a $4,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v pitné vodě. Dále byly prostudovány elektrochemické vlastnosti chloramfenikolu metodou cyklické voltametrie v prostředí BR pufru o pH 2, 6, 8, 12 a objasněn mechanismus redukce chloramfenikolu na m-AgSAE na základě dostupné literatury. Chloramfenikol byl stanoven v léčivu Spersadex na m-AgSAE metodou DPV v prostředí BR pufru o pH 8.

Ve druhé části práce byly zkoumány podmínky pro stanovení chlorambucilu na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě pomocí CV a DPV. Prostředí chloridu draselného o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a methanolu v poměru 1:1 bylo zvoleno jako optimální. Při tomto zvoleném prostředí byl sledován vliv regeneračních potenciálů na stabilitu signálu chlorambucilu pomocí DPV. Bohužel se nepodařilo nalézt vhodné podmínky pro stanovení chlorambucilu na m-AgSAE.

Abstract

This diploma thesis is focused on the determination of chloramphenicol by differential pulse voltammetry (DPV), DC voltammetry (DCV), cyclic voltammetry (CV) and adsorptive stripping voltammetry (AdSV) on a meniscus modified silver solid amalgame electrode (m-AgSAE). For the determination of chloramphenicol the optimum conditions were found and under these conditions concentration dependences were measured and then limits of quantification were determined.

The influence of pH of BR buffer was tested. For determination of chloramphenicol by DCV pH 7 was chosen as an optimum background and pH 8 was chosen as an optimum for DPV determination. Under these conditions linear dependences were obtained in the concentration range of $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. The limit of detection of chloramphenicol by DCV was $2.3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. The limit of detection of chloramphenicol by DPV was $2.1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ in distilled water, $2.9 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ in river water and $4.2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ in drinking water. Electrochemical behavior of chloramphenicol was studied by cyclic voltammetry in BR buffer with pH 2, 6, 8, 12 and then mechanism of reduction of chloramphenicol was propose based on available literature. Chloramphenicol was determined in drug Spersadex by DPV in BR buffer with pH 8.

The optimal conditions for determining of chlorambucil were studied by CV and DPV. Potassium chloride $0.2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ with methanol in ration 1:1 was choosen as optimum for determination of chlorambucil. The influence of regeneration potentials was studied by DPV under this condition. However the optimal conditions for determination of chlorambucil on the m-AgSAE were not found.

Předmětová hesla:

Analytická chemie

Elektrochemie

Klíčová slova:

DC voltametrie

Diferenční pulzní voltametrie

Cyklická voltametrie

Adsorpční rozpouštěcí voltametrie

Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda

Chloramfenikol

Chlorambucil

Objective word:

Analytical Chemistry

Electrochemistry

Key words:

DC voltammetry

Differential pulse voltammetry

Cyclic voltammetry

Adsorptive stripping voltammetry

Mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode

Chloramphenicol

Chlorambucil

Seznam použitých zkratk a symbolů

$A_{1cm}^{1\%}$	– specifická absorbance
A	– absorbance
AdSV	– adsorpční rozpouštěcí voltametrie
BR pufr	– Brittonův–Robinsonův pufr
BDDFE	– borem dopovaná diamantová filmová elektroda
c	– molární koncentrace [mol.l ⁻¹]
CAP	– chloramfenikol
CV	– cyklická voltametrie
DCV	– DC voltametrie
DPV	– diferenční pulzní voltametrie
$E_{1/2}$	– půlvlnový potenciál [mV]
E_{acc}	– potenciál akumulace [mV]
E_p	– potenciál píku [mV]
EPGCE	– elektroda ze skelného uhlíku s elektrochemickou předúpravou povrchu
HMDE	– visící rtuťová kapková elektroda
HPLC	– vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHL	– chlorambucil
I_p	– proud píku [nA]
I_v	– proud vlny [nA]
LOQ	– mez stanovitelnosti [mol.l ⁻¹]
m-AgSAE	– rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda
p_a	– anodický pík
pH	– záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových inotů
p_k	– katodický pík
SMDE	– statická rtuťová kapková elektroda
SWV	– square wave voltametrie
RSD	– relativní směrodatná odchylka
t_{acc}	– doba akumulace [s]

Obsah

1	Úvod	- 10 -
1.1	Cíl práce	- 10 -
1.2	Studované látky	- 10 -
1.2.1	Chloramfenikol	- 10 -
1.2.2	Užití a biologické účinky	- 11 -
1.2.3	Metody stanovení	- 12 -
1.2.4	Chlorambucil	- 14 -
1.2.5	Užití a biologické účinky	- 15 -
1.2.6	Metody stanovení	- 16 -
1.3	Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda	- 18 -
1.4	Aplikace rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrody	- 20 -
2	Experimentální část	- 22 -
2.1	Reagencie	- 22 -
2.2	Aparatura	- 23 -
2.3	Pracovní postupy	- 24 -
3	Voltametrické stanovení chlorambucilu na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě	- 27 -
3.1	Cyklická voltametrie	- 27 -
3.2	Diferenční pulzní voltametrie	- 28 -
4	Voltametrické stanovení chloramfenikolu na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě	- 30 -
4.1	DC Voltametrie	- 30 -
4.1.1	Vliv pH	- 30 -
4.1.2	Kalibrační závislosti	- 33 -
4.2	Diferenční pulzní voltametrie	- 35 -
4.2.1	Vliv pH	- 35 -
4.2.2	Kalibrační závislosti	- 38 -
4.2.3	Stanovení chloramfenikolu v pitné a říční vodě pomocí diferenční pulzní voltametrie	- 40 -
4.3	Cyklická voltametrie	- 44 -

4.4 Adsorpční rozpouštěcí voltametrie.....	- 49 -
4.5 Stanovení chloramfenikolu ve vzorku léčiva Spersadex.....	- 51 -
5 Závěr.....	- 53 -
6 Literatura	- 56 -

1 Úvod

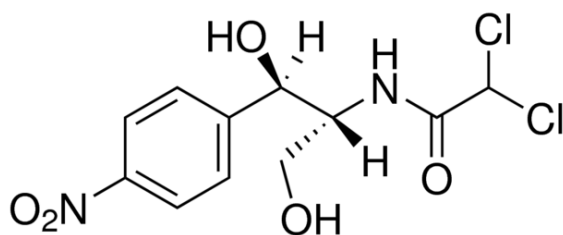
1.1 Cíl práce

Tato diplomová práce se zabývá vývojem metod pro voltametrické stanovení léčiv chloramfenikolu a chlorambucilu. Jejím cílem je nalézt vhodné podmínky pro stanovení a určit nejnižší mez stanovitelnosti těchto látek na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě (m-AgSAE). Dalším cílem je ověření použitelnosti metod v reálných maticích a ve vzorku léčiva.

1.2 Studované látky

1.2.1 Chloramfenikol

Chloramfenikol se řadí mezi širokospektrální antibiotika (obr. 1.1). Chloramfenikol byl izolován poprvé v roce 1948 ze *Streptomyces Venezuelae* Davidem Gottliebem.¹ Po řadu let se chloramfenikol používal jako levné a přitom vysoce účinné širokospektrální antibiotikum proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím, riketsiím a spirochétám.^{1,2} V tabulce 1.1 jsou uvedeny základní informace o chloramfenikolu. Chloramfenikol je bílý, šedobílý až žlutobílý jemný prášek či jemné krystaly, jehličky nebo protáhlé destičky. Je méně rozpustný ve vodě, ale více v ethanolu a v propylenglykolu.³



Obrázek 1.1 *Strukturní vzorec chloramfenikolu*

Tab. 1.1 Základní informace

triviální název	chloramfenikol
systematický název	2,2-dichlor-N-[(1R,2R)-2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-2-(4-nitrofenyl)ethyl]acetamid
sumární vzorec	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₅
CAS registrační číslo	56-75-7
relativní molekulová hmotnost	323,14

1.2.2 Užití a biologické účinky

Chloramfenikol je někdy zařazován do samotné skupiny amfenikolů. Amfenikoly se váží na ribozomy bakterií a inhibují aktivitu enzymu peptidyltransferázy. Dochází tak k zablokování prodlužování řetězce proteinu, a proto nelze připojit nové aminokyseliny.^{4,5} Chloramfenikol je používán při léčbě těžkých pneumokokových a meningokokových infekcí. Dále se také používá k léčbě očních infekcí postihující rohovky nebo spojivky, k léčbě akutních infekcí zevního zvukovodu nebo infekce kůže.^{4,6,7} Po perorální podání se rychle resorbuje a v organismu se rozděluje rovnoměrně, snadno prostupuje do likvoru, pleurálního prostoru i do placenty. Chloramfenikol je metabolizován v játrech, kde podléhá biotransformaci za tvorby konjugátů s kyselinou glukuronovou. Vylučován je převážně močí, pouze 5-15 % látky je vylučováno v nezměněné formě.⁸ Při dlouhodobější terapii chloramfenikolem se může vyvinout těžké toxické poškození krvetvorné soustavy a to dvěma formami. První je tzv. agranulocytóza a trombocytopenická purpura, které jsou závislé na dávce a jsou reverzibilní. Druhá forma je tzv. aplazie a pancytopenie, nezávislá na dávce, často se smrtícím průběhem. U předčasně narozených dětí může dojít k tzv. grey syndromu, podle šedé barvy kůže.^{5,9} Právě díky těmto závažným nežádoucím účinkům je použití chloramfenikolu v humánní a veterinární medicíně omezeno. Pro použití v potravinách živočišného původu je chloramfenikol zakázán na území celé Evropské unie a Spojených států amerických.^{6,10} V zemích třetího světa je však stále používán.² Díky nízkým výrobním nákladům a poměrně vysoké účinnosti je tak chloramfenikol používán v živočišné výrobě a ve veterinární praxi jako doplňková látka pro podporu růstu. Bylo zjištěno, že určité množství reziduí antibiotik v lidských potravinách může vyvolat

alergické reakce a u některých citlivých jedinců celkově poškodit imunitní systém.¹¹ Přítomnost reziduí chloramfenikolu byla zjištěna v živočišných potravinách, které byly dováženy převážně z asijských zemí¹². Jednalo se zejména o potraviny, jako jsou např. drůbež, med, krevety nebo sušené mléko.^{13,14}

1.2.3 Metody stanovení

Pro stanovení chloramfenikolu byla vyvinuta řada technik. Patří sem především kapalinová¹⁵ a plynová chromatografie¹⁶, UV spektrofotometrie¹⁷ nebo kapilární zónová elektroforéza s amperometrickou detekcí.^{18,19} Dle dostupné literatury je vidět, že pro stanovení chloramfenikolu se nejvíce využívá chromatografických metod ve spojení s hmotností detekcí.^{12,20} Chloramfenikol byl stanoven i mnoha elektroanalytickými metodami.^{6,21}

1.2.3.1 Separační metody

Chloramfenikol byl stanoven metodou plynové chromatografie ve spojení s hmotností detekcí se zápornou chemickou ionizací (GC-NCI/MS) v játrech a svalech u drůbeže a prasat. Detekční limit byl $3,1 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. (cit. ¹⁶) Pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC/MS) byl chloramfenikol stanoven ve včelím pylu. Stanovení nejprve předcházela dvoustupňová extrakce (SPE) a poté separace na C18 koloně s mravenčanem amonným v acetonitrilu jako mobilní fází. Mez detekce byla v rozmezí $2,5 - 3,7 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. (cit. ²⁰) Pro stanovení reziduí chloramfenikolu v drůbežích játrech, ledvinách a ve svalech bylo využito metody kombinace HPLC s UV detekcí a imunochemickou metodou ELISA. Detekční limit pro chloramfenikol byl $2,5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, největší množství chloramfenikolu bylo zjištěno v játrech $193 \pm 15 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ a nejmenší množství bylo ve svalech $2,64 \pm 0,2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$. (cit. ²²) Pro další stanovení reziduí chloramfenikolu bylo využito kombinace chromatografických metod, kde plynová chromatografie (GC/MS) poskytovala screening reziduí chloramfenikolu a kapalinová chromatografie (LC/MS) vystupovala jako potvrzující metoda s detekčním limitem $1,4 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. (cit. ¹²)

Pomocí kapilární zónové elektroforézy s amperometrickou detekcí byl chloramfenikol stanoven v očních kapkách s detekčním limitem $1,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. (cit. ¹⁹) Dále byl chloramfenikol stanoven s detekčním limitem $9,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pomocí

kapilární zónové elektroforézy s amperometrickou detekcí na mikordeskové elektrodě z uhlíkového vlákna.¹⁸

1.2.3.2 Elektroanalytické metody

Chloramfenikol je látkou snadno redukovatelnou díky své struktuře obsahující nitroskupinu. Proto může být stanoven pomocí voltametrických a polarografických metod na vhodné pevné, pastové či rtuťové elektrodě.

Chloramfenikol byl stanoven na elektrodě ze skelného uhlíku pomocí cyklické voltametrie v prostředí acetátového pufru o pH 5. Stanovení bylo provedeno v očních kapkách, ústní suspenzi a v prášku pro přípravu injekčního roztoku. Limit detekce byl $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. (cit. ⁶) Další stanovení chloramfenikolu bylo provedeno na elektrodě ze skelného uhlíku s elektrochemickou předúpravou povrchu elektrody za využití cyklické a square-wave voltametrie. Tato úprava vede ke zlepšení vlastností povrchu elektrody a má vliv na kinetiku elektrodoových procesů. Stanovení bylo provedeno v acetátovém pufru o pH 5,3 s detekčním limitem $6 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Tato vyvinutá metoda byla jednoduchá, relativně rychlá a úspěšně aplikovaná ve farmaceutickém průmyslu pro stanovení chloramfenikolu v očních kapkách.¹ Metodou diferenční pulzní voltametrie byl chloramfenikol stanoven na čtyřech pastových uhlíkových elektrodách v rozsahu BR pufru v rozmezí pH 2 – 12. V tomto případě byl zkoumán negativní vliv kyslíku na voltametrická měření a jeho odstranění přidáním siřičitanu sodného. Limit detekce byl $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. V dalším případě byl chloramfenikol stanoven na mikroelektrodách z uhlíkových vláken pomocí square-wave voltametrie v prostředí fosfátového pufru o pH 7,8 s detekčním limitem $4,7 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. (cit. ²³) Metodou lineární sweep voltametrie byl chloramfenikol stanoven na elektrodě ze skelného uhlíku modifikované niklem. Stanovení bylo provedeno v prostředí 0,1M NaOH s detekčním limitem $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. (cit. ²⁴)

Chloramfenikol byl také studován na borem dopované diamantové filmové elektrodě metodou cyklické voltametrie a následně stanoven FIA s amperometrickou detekcí. Nejvyšší signál chloramfenikolu byl získán s fosfátovým pufrům o pH 6 v 1 % ethanolu s detekčním limitem $3 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Metoda byla navržena pro stanovení chloramfenikolu v očních kapkách a ve vzorku mléka.²⁵

Na stacionární rtuťové elektrodě byl chloramfenikol stanoven pomocí square-wave voltametrie v prostředí acetátového pufru o pH 4 s detekčním limitem $3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. (cit. ²⁶)

1.2.3.3 Spektrometrické metody

Spektrometrické metody jsou stále více využívány v biomedicíně a farmaceutickém průmyslu pro analýzu léčiv. Výhodou těchto metod je, že pro stanovení léčiva lze využít celý rozsah absorpčního spektra. To je vhodné především u stanovení složitých směsí analytů. Další výhodou je rychlost stanovení a obvykle není potřeba předchozí separace. Chloramfenikol lze stanovit měřením absorbance v ultrafialové i ve viditelné oblasti viditelného světla.¹⁷ Pro stanovení chloramfenikolu ve viditelné oblasti byla vyvinuta metoda, při které bylo využito reakce chloramfenikolu a molybdenanu amonného. Limit detekce byl $1,1 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. (cit. ²⁷)

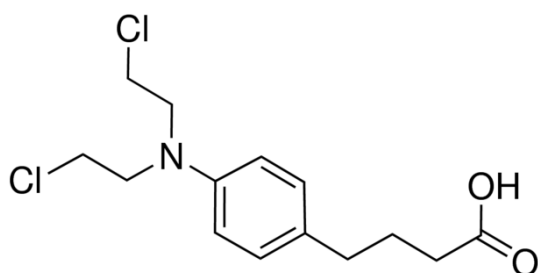
1.2.4 Chlorambucil

Chlorambucil je cytostatikum s alkylujícím mechanismem účinku a řadí se mezi aromatické deriváty dusíkatého yperitu (obr. 1.2). První syntéza byla provedena roku 1953 britskými vědci pod vedením J.L.Everetta. Od roku 1961 se využívá jako léčivo Leukeran. Chlorambucil je používán při maligním lymfomu, chronické lymfocitární leukemii a u Hodgkinovy choroby.^{28,29} V tabulce 1.2 jsou uvedeny základní informace o chlorambucilu.

Chlorambucil je bílý, krystalický prášek, který je prakticky nerozpustný ve vodě. Dobře rozpustný je v acetonu nebo ethanolu 96 %. (cit. ³) Chlorambucil má nižší teplotu tání (64 – 66 °C). Přesto že má chlorambucil nízkou rozpustnost ve vodě, snadno podléhá hydrolyze ve vodných roztocích.³⁰

Tabulka 1.2 *Základní informace*

triviální název	chlorambucil
systematický název	(4-(4-[bis-(2-chlorethyl)amino]fenyl))butanová kyselina
sumární vzorec	$C_{14}H_{19}Cl_2NO_2$
CAS registrační číslo	305-03-3
relativní molekulová hmotnost	304,21



Obrázek 1.2 *Struktura látky chlorambucilu*

1.2.5 Užití a biologické účinky

Cytostatikum chlorambucil účinkuje jako alkylační činidlo. Tyto sloučeniny jsou velmi chemicky nestabilní. Mechanismus působení chlorambucilu spočívá v přenosu vysoce reaktivních alkylů na různé buněčné složky, zejména pak na DNA zdravých i maligních buněk. Navázáním alkylového radikálu na DNA dochází k inhibici procesů buněčného dělení. Tímto je dosažen požadovaný terapeutický účinek na maligní tkáň. Hlavním metabolitem chlorambucilu je o dva uhlíky kratší 4-[bis(2-chlorethyl)amino]fenyl octová kyselina (zkráceně označována PAAM z anglického *phenylacetic acid mustard*). Tato kyselina vzniká β -oxidací postranního řetězce kyseliny máselné.^{5,29} Chlorambucil je především indikován při chronické lymfocytární leukemii (CLL). Toto onemocnění patří k nejčastější leukemii v západním světě. Tvoří 30% všech diagnostikovaných leukemií. Podstatou tohoto onemocnění je nahromadění B-lymfocytů s typickým imunofenotypem v periferní krvi, lymfatických uzlinách, kostní dřeni a dalších orgánech.³¹ Dále je indikován k léčbě Hodgkinovy choroby, některých forem nehodgkinských lymfomů u karcinomu prsu, vaječníku a dělohy. Mezi

nejčastější vedlejší příznaky patří ztráta chuti k jídlu, nauzea a průjemy. Může dojít i k nekrózám v ledvinách a vývodných močových cestách. Asi po jednom až dvou týdnech terapie chlorambucilem dochází k poklesu počtu lymfocytů a granulocytů, později pak i počtu trombocytů a erytrocytů. Dále dochází k vypadávání vlasů a ochlupení, které se po dvou až třech měsících obnovuje i při pokračující léčbě.⁵

V posledních letech se přísun nových cytostatik do klinické praxe značně omezil. Bylo sice zavedeno větší množství derivátů osvědčených cytostatik, ale jejich efektivita však většinou zásadním způsobem nepředčila původní, mateřské látky. Pouze ojediněle se objevily látky zcela nové struktury. Avšak velkému uplatnění se dostalo některým cytostatikům modifikovaným vazbou na různé nosiče.³² Publikována byla studie, kde bylo využito kombinace chlorambucilu s estradiolem pro léčbu rakoviny prsu. Jedna z možných příčin vzniku rakoviny prsu u žen je pokles hormonální hladiny estradiolu. Vazba cytostatika na hormonální nosič tak může výrazně zvýšit účinnost léčiva.³³ Dalším možným způsobem modifikace jsou cytostatika enkapsulovaná do liposomů. Liposomy jsou lipidové partikule o velikosti asi 1 – 2 μm . Vnější lipidová vrstva je tvořena dvěma lipidovými vrstvami a vnitřním vodním prostorem. Cytostatikum je inkorporováno do vnitřního prostoru. Liposomy tak snadněji pronikají do tkáně nádoru. Této vazby bylo využito i u chlorambucilu, čímž se zvýšil jeho léčivý účinek a také chemická stabilita.^{30,32}

1.2.6 Metody stanovení

Vývoj metody pro stanovení chlorambucilu závisí na biologické matici a předpokládané koncentraci analytu ve vzorku. V dostupné literatuře jsou publikovány práce, které jsou zaměřeny na stanovení chlorambucilu pomocí separačních technik, je to především vysokoúčinná kapalinová chromatografie³⁴ nebo kapalinová chromatografie na reverzní fázi s hmotnostní detekcí.³⁵ Elektrochemické vlastnosti chlorambucilu byly studovány i pomocí elektroanalytických metod.^{36,37}

1.2.6.1 Separační metody

V poslední době je čím dál větší pozornost věnována kontaminaci životního prostředí ze strany veterinárních a humánních léčivých přípravků. Jejich detekce vyžaduje velmi citlivé, přesné a specifické metody. Často jsou využívány separační metody ve spojení s hmotnostní detekcí. Jedna taková metoda byla navržena pro stanovení 19 cytostatik včetně chlorambucilu. Stanovení bylo provedeno pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí s detekčním limitem chlorambucilu $3 \cdot 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. (cit. ³⁸) Další metoda pomocí kapalinové chromatografie s předchozí extrakcí (SPE) byla vyvinuta pro stanovení skupiny cytostatik v odpadních vodách. Detekční limit pro chlorambucil byl $4,9 \cdot 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. (cit. ³⁹) Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s DAD a fluorescenční detekcí byla stanovena skupina cytostatik. Detekční limit pro chlorambucil byl $6,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. (cit. ⁴⁰) Pro samotné stanovení chlorambucilu v léčivém přípravku byla navržena metoda HPLC na reverzní fázi s amperometrickou detekcí. Hodnota detekčního limitu byla $3,3 \cdot 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. (cit. ³⁴) Pro stanovení chlorambucilu a jeho hlavního metabolitu PAAM (z angl. phenylacetic acid mustard) v lidské plasmě a séru byla vyvinuta metoda HPLC na reverzní fázi s hmotnostní detekcí. Stanovení bylo vhodné a citlivé pro koncentrační rozmezí $1,3 - 2,6 \cdot 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro obě studované látky.³⁵

1.2.6.2 Elektroanalytické metody

Elektrochemické vlastnosti chlorambucilu byly studovány pomocí adsorpční rozpouštěcí voltametrie na statické rtuťové elektrodě (SMDE) v prostředí acetátového pufru o pH 5,4. Zde byl pozorován signál látky při potenciálu $-1,3 \text{ V}$ (vs Ag/AgCl), ale nebyl objasněn mechanismus příslušné elektrochemické reakce. Detekční limit byl $3 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Pomocí cyklické voltametrie byl studován vliv interferujících látek na stanovení chlorambucilu. Vyvinutá metoda je jednoduchá, rychlá a dostatečně citlivá pro stanovení v klinických vzorcích.⁴¹ Oxido-redukční vlastnosti chlorambucilu v přítomnosti 4-chlor-butyronitrilu byly studovány pomocí cyklické voltametrie na platinové elektrodě. Jako optimální prostředí byl zvolen $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátový pufr o pH = 7. (cit. ³⁶)

1.3 Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda

Používání pracovních elektrod na základě kovové rtuti je v polarografii a v metodách od ní odvozených stále považováno za nejlepší z hlediska reprodukovatelnosti výsledků měření. Bohužel, kvůli obavám z toxicity kovové rtuti, se rozsah jejího použití jako elektrodového materiálu buď zmenšuje, nebo se tento druh elektrod zakazuje úplně. Je to jeden z důvodů, proč se v posledních letech hledají a vyvíjejí nové elektrodové materiály, které by nahradily rtuť. Zároveň by tyto materiály měly co nejvíce odpovídat konceptu tzv. zelené analytické chemie. Nejvíce těmto požadavkům odpovídají elektrody z pevných a pastových amalgámů. Dle stavu povrchu amalgámové elektrody tak máme k dispozici např. leštěnou pevnou amalgámovou elektrodu neobsahující rtuť, leštěnou elektrodu pokrytou rtuťovým filmem, leštěnou elektrodu pokrytou rtuťovým meniskem, pastové nebo kompozitní elektrody. Podle základních vlastností lze amalgámové elektrody rozdělit do dvou hlavních skupin. Buď může být amalgám tvořen kovem nebo kovy v případně vícesložkových amalgámů (např. Au, Ag, Ir), který je elektrochemicky méně aktivní než rtuť. Nebo je amalgám tvořen více elektrochemicky aktivním kovem než rtuť.⁴²

Příprava pevných amalgámových elektrod je poměrně jednoduchá a lze je připravit v každé laboratoři. Do vhodné skleněné trubičky se napěchuje do dolní části jemný prášek kovu (např. Au, Ag, Cu) vysoký asi 0,5 – 1 cm. Do horní části trubičky je zaveden platinový drátek, který slouží jako kontakt. Takto připravená elektroda se ponoří do kapalně rtuti a ponechá se v ní přes noc.^{43–46} Tím se vytvoří mechanicky stabilní a netoxický amalgám (jak je dokázáno mnohaletými zkušenostmi při přípravě zubních plomb.⁴⁷) Vzniklý amalgám lze mechanicky vyleštit a tím tak připravit tzv. leštěnou stříbrnou pevnou amalgámovou elektrodu. Pro analytické účely je vhodnější rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda.⁴³

Pro úspěšnou aplikaci pevných amalgámových elektrod jsou nutné 3 základní kroky: amalgamace, aktivace a regenerace.⁴⁴ Amalgamace se provádí jednou za týden nebo i vícekrát, pokud je potřeba. Během měření může totiž dojít ke zhoršení citlivosti či reprodukovatelnosti. Není-li patrný meniskus kapalněho amalgámu, je dobré provést amalgamací znova. Obnova menisku spočívá v ponoření elektrody do kapalně rtuti. Aktivace elektrody se provádí vždy na začátku dne nebo po delším přerušení. Aktivací se z povrchu elektrody odstraňují oxidy a adsorbované látky. Zvyšuje se tím citlivost

a reprodukovatelnost pro další měření. Poslední krok regenerace se provádí v analyzovaném roztoku před měřením. Parametry regeneračních potenciálů mohou být předdefinované v programu analyzátoru nebo je lze měnit a nastavit v daném okně programu. Aby došlo k obnově povrchu elektrody, postačí většinou vložit na elektrodu asi po dobu 20 – 30 sekund potenciál o 50 – 100 mV pozitivnější, než je potenciál vylučování vodíku nebo rozklad základního elektrolytu. Při této hodnotě potenciálu se redukují oxidy kovů tvořících pevný amalgám a odstraňují se adsorbované látky. Zároveň však probíhá akumulace většiny kovů v analyzovaném roztoku. Provedením skokové změny potenciálu z negativních hodnot na pozitivnější se zabrání nekontrolovatelné akumulaci těchto kovů. Naakumulované kovy se tak rozpouštějí. Pozitivnější potenciál by však neměl dosáhnout takové hodnoty, aby docházelo k rozpouštění materiálu elektrody nebo k rozkladu základního elektrolytu.⁴⁴

Pevné amalgámové elektrody modifikované rtuť (meniskem nebo filmem) se z analytického hlediska jeví jako nejlepší. Díky jejich kapalnému povrchu, ideálně rovnému a stejnorodému, je tak vyloučen asi největší problém pevných elektrod – jejich mechanická regenerace, často doprovázená špatnou opakovatelností měření. Obnovení povrchu pevných elektrod je umožněno pomocí analyzátoru, který je řízen počítačem. Tím je dovoleno dosáhnout RSD menší než 2 – 3 % při opakovaných měřeních a lze tak využít pevné amalgámové elektrody v průtokových systémech např. amperometrický detektor v HPLC.⁴⁴

Stříbrná pevná amalgámová elektroda byla vyvinuta v rámci výzkumu nových elektrod na Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR.^{45,46} Pro výrobu elektrod je stříbro jedním z nejpoužívanějších materiálů. Velmi důležité je, že stříbro rozpuštěné ve rtuťi netvoří intermetablické sloučeniny s jinými kovy. Pracovní rozsah potenciálů pevných stříbrných elektrod se nejvíce blíží k HMDE. Mohou tak být vhodnou alternativou za HMDE pro většinu analytických měření, práce s nimi je pohodlnější a lze je využít i pro měření v terénu. Shodné hodnoty proudu pozadí a potenciály DPV-píků na m-AgSAE a HMDE dovolují vzájemně přenášet a použít pracovní postupy dříve vypracované pro rtuťové elektrody.

Mezi hlavní technické a uživatelské přednosti pevných amalgámových elektrod patří:

- široký rozsah pracovních potenciálů;
- elektrochemická obnova povrchu elektrod modifikovaných rtuťí;
- neomezená životnost elektrod (po dobu 8 let nebyla prakticky zaznamenána žádná změna vlastností) a snadné uvedení do provozu i po přestávce několika měsíců;
- elektrody z pevných amalgámů jsou zcela netoxické
- aplikace elektrod do mobilních laboratoří a snadná zabudovatelnost do průtokových systémů;
- při přípravě elektrod využitelnost kovů, které nelze zatavit do skla (Ag,Cu), čímž odpadá nutnost použití speciálních lepidel
- možnost volby vhodného tvaru a rozměru elektrod a jednoduchá konstrukce⁴⁴

1.4 Aplikace rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrody

Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda byla využita pro stanovení kationtů, především těžkých kovů. Stanovení kovových iontů je důležitou součástí monitoringu životního prostředí, sledování výskytu škodlivých látek a biogenních prvků v tělních tekutinách atd. Pomocí m-AgSAE bylo provedeno stanovení As^{3+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , In^{3+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , Tl^{1+} , Zn^{2+} . (cit. ^{44,48}) Anodická rozpouštěcí voltametrie (ASV) na m-AgSAE byla použita pro analýzu směsi kationtů Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Tl^{2+} . Při práci s m-AgSAE lze použít delší akumulací čas než na HDME (až 1 hodina) a tak zvýšit citlivost analýzy.⁴⁹

Stanovení aniontů na m-AgSAE může proběhnout různými elektrochemickými procesy, jako je redukce (IO^{3-} , Nb^{5+}), katalytické jevy (NO^{3-}), chemisorpce v kombinaci s následujícím katodickým scanem (Cl^- , Br^- , I^- , CNS^-) nebo adsorpce (Cr^{6+}). Na m-AgSAE bylo také provedeno stanovení jodičnanů v kuchyňské soli.^{44,48}

Pro analýzu organických látek patří voltametrická měření k těm velice citlivým, nevyžadujícím složitou a drahou techniku. Například mez stanovitelnosti na úrovni 10^{-8} až $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ je běžná pro stanovení adeninu, guaninu, cysteinu i cystinu. m-AgSAE

byla úspěšně použita pro studium DNA. m-AgSAE byla využita pro detekci enzymatického nebo chemického štěpení DNA v roztoku nebo na povrchu elektrody, dále pro detekci zlomů na řetězci DNA vyvolané ionizujícím zářením.⁴⁹ Pomocí meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrody byla provedena celá řada analýz nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků (NPAH) a nitrobenzenů (1-nitronaftalen, 2-nitronaftalen, 2-nitrobifenylyl, nitrobenzen, 2-nitrofenol, 1,5-dinitronaftalen), dále karcinogenní látka 3-nitrofluorathen.^{48,50} Na m-AgSAE byly metodou DPV stanoveny pesticidní látky, jako pendimethalin, 2-methyl-4,6-dinitrofenol, oxyfluorfen, bifenox.⁴⁹ Léčiva proti rakovině jako doxorubicin, carmustin, flutamid a lomustin byla také úspěšně stanovena pomocí m-AgSAE.⁴⁹

V metodě průtokové injekční analýzy byla m-AgSAE využita ve „wall jet“ uspořádání pro detekci 4-nitrofenolu a 5-nitrochinolinu.⁴⁹ U chromatografické metody HPLC nachází m-AgSAE uplatnění jako amperometrický detektor na výstupu z kolony. Pro měření vzácných nebo drahých látek s pomocí AgSAE byla zhotovena tříelektrodová cela na velmi malé objemy vzorku, což je vhodné např. pro studium DNA.⁴⁸

2 Experimentální část

2.1 Reagencie

Zásobní roztok chloramfenikolu (>více než 99 %, Sigma-Aldrich, Praha, ČR) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním přesně naváženého množství dané látky ve 25 ml deionizované vody. Zásobní roztok chlorambucilu (Sigma-Aldrich, Praha, ČR) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním přesně naváženého množství dané látky v 10 ml methanolu (Lachner, Neratovice, ČR). Roztoky o nižších molaritách byly připravovány přesným ředěním zásobních roztoků dané látky pomocí methanolu, pufru nebo neionizované vody. Zásobní roztok chloramfenikolu byl uchováván ve tmě za laboratorní teploty. Již dříve bylo zjištěno, že zásobní roztok chloramfenikolu je stálý déle než jeden měsíc.⁵¹ Roztok chlorambucilu byl připravován každý den čerstvý.

Brittonovy – Robinsonovy pufrы (BR – pufr) o příslušné hodnotě pH byly připraveny smísením $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH (Penta, Praha, ČR) s roztokem obsahujícím kyselinu fosforečnou (Lachema, Brno, ČR), boritou (Lachema, Brno, ČR) a octovou (Lachema, Brno, ČR) každá o koncentraci $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Acetátový pufr byl připraven rozpuštěním vypočteného množství octanu sodného (Lachema, Brno, ČR) v 50 ml deionizované vody. Přidáním $0,02 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ kyseliny octové (Lachema, Brno, ČR) se tento roztok upravil na požadované pH. Všechny uvedené chemikálie pro přípravu tlumivých roztoků byly čistoty p.a. Roztok chloridu draselného (Lachner, Neratovice, ČR), čistota p.a., o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním přesně naváženého množství látky ve 100 ml. Pro přípravu vodných roztoků byla používána deionizovaná voda (Millipore Q-plus systém, Millipore, USA).

Pro stanovení chloramfenikolu v pitné vodě byla dne 19.8.2014 odebrána voda z vodovodu v budově chemických kateder přírodovědecké fakulty UK Praha, Hlavova 8, Praha 2. Pro stanovení chloramfenikolu v říční vodě byla dne 21.8.2014 odebrána voda z řeky Vltavy, Náplavka, Praha 2.

Léčivo Spersadex (šarže 421689, Laboratoires THEA, Clermont-Ferrand, Cedex 2, Francie, Novartis s.r.o., Praha, Česká republika) oční kapky, roztok, 5ml. Složení léčiva: chloramphenicolum 5 mg a dexamethasoni natrii phosphas 1 mg v 1 ml roztoku, benzalkonium-chlorid, makrogol 400, glyceromakrogolricinoleát, dinatrium-edetát, roztok hydroxidu sodného, voda.

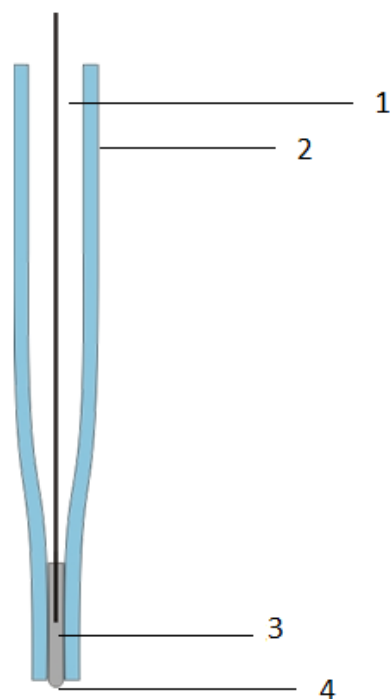
2.2 Aparatura

Všechna voltametrická měření (DPV voltametrie, DC voltametrie, cyklická voltametrie a AdSV) byla provedena na sestavě Mini – and Microelectrode System UM μ E (ETP-21-10) se softwarem Polar.Pro verze 5.1, firma Polaro – Sensors, Praha, ČR. Software pracoval v operačním systému Windows XP.

Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení, ve kterém byla použita argentchloridová elektroda ($3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl, Eco Trend Plus, ČR) jako referentní a jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda (Eco Trend Plus, ČR). Pracovní elektrodou byla meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda č. 2-05-26 o průměru disku 0,5 mm vyrobená firmou Polaro – Sensors, Praha, ČR (obr 2.1). Pro měření s HMDE byla použita pracovní rtuťová elektroda od firmy Polaro – Sensors, Praha, ČR. Při měření DPV byly na elektrodu vkládány pulsy o šířce 100 ms a modulační amplitudě -50 mV. Není-li uvedeno jinak, rychlost nárůstu potenciálu byla $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ při DPV, DCV i CV.

Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem Jenway 4330 (Jenway Essen, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005, Jenway LTD, Essex, Velká Británie). Kalibrace pH-metru byla prováděna standardními vodnými pufrů za laboratorní teploty.

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Agilent Technologies 8453 (Agilent, USA), který je určený k proměření roztoků v UV/VIS oblasti spektra v rozsahu 190 – 1100 nm. Spektrofotometr je řízen pomocí počítačového programu UV-VisibleChemStation, verze 9.01. Všechna měření byla prováděna v křemenných kyvetách měrné tloušťky 10 mm.



Obrázek 2.1 Meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda: elektrických kontakt (1), skleněná kapilára (2), tuhý stříbrný amalgám (3), rtuťový meniskus (4) (cit. ⁵²)

2.3 Pracovní postupy

Meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda procházela vždy třemi základními operacemi: 1) Amalgamace: ponoření elektrody do kapalné rtuti na dobu asi 15 sekund a mírné zamíchání, tím se vytvořil rtuťový meniskus. Amalgamace se prováděla vždy na začátku dne. 2) Elektrochemická aktivace: aktivace spočívala v tom, že elektroda byla ponořena do míchaného roztoku chloridu draselného o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, který nebyl probubláván dusíkem, při vloženém potenciálu $-2,2 \text{ V}$ po dobu 300 s. Aktivace byla prováděna vždy po amalgamací elektrody nebo po jedné hodině při dlouhodobějším měření. 3) Regenerace: tento krok byl prováděn přímo v měřeném roztoku při současném bublání dusíkem a míchání roztoku. Bylo použito skokové střídání kladnějšího konstantního potenciálu E_{reg1} a zápornějšího konstantního potenciálu E_{reg2} v intervalech 0,1 s a po dobu 30 s. Elektrochemická regenerace končila vždy při zápornějším potenciálu. Regenerace byla prováděna jen v některých případech.

Při voltametrických měřeních chloramfenikolu bylo do 10 ml odměrné baňky

odpipetováno příslušené množství roztoku studované látky ve vodě, poté byl roztok doplněn BR pufrům o daném pH až po rysku. Při stanovení chlorambucilu bylo do 10 ml odměrné baňky odpipetováno příslušné množství roztoku studované látky v methanolu, přidán methanol do celkového objemu 5 ml a následně byl roztok doplněn $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ chloridem draselným, acetátovým pufrům nebo BR pufrům o příslušném pH po rysku. Takto připravený roztok byl po promíchání převeden do polarografické nádoby. Před voltametrickým měřením byl čerstvě připravený roztok probubláván dusíkem po dobu 5 minut a zbaven tak přítomnosti kyslíku. Následně byl proveden záznam voltametrické křivky. Před každým dalším voltametrickým záznamem byl roztok probubláván jen 15 s. Křivky základního elektrolytu byly měřeny třikrát a křivky se studovanou látkou byly měřeny pětkrát. Všechna měření se prováděla za laboratorní teploty.

Při voltametrickém stanovení chloramfenikolu v pitné a říční vodě bylo k 9 ml vzorku matrice vody s potřebným množstvím zásobního roztoku chloramfenikolu přidán jeden 1 ml BR pufru o pH 8 na celkový objem 10 ml.

Při stanovení chloramfenikolu ve vzorku léčiva Spersadex byl nejprve připraven zásobní roztok léčiva tak, že bylo odpipetováno 645 μl roztoku očních kapek do odměrné baňky a doplněno po rysku na 10 ml deionizovanou vodou. Následně bylo odpipetováno do odměrné baňky 400 μl tohoto zásobního roztoku léčiva a doplněno do 10 ml po rysku BR pufrům o pH 8. Takto připravený roztok byl převeden do polarografické nádoby a byl proveden voltametrický záznam. Po té bylo přímo k roztoku přidáno ve třech krocích vždy 200 μl zásobního roztoku chloramfenikolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a proveden záznam křivky mezi jednotlivými přídávky. Takto byla provedena metoda standardního přídávku s přidávanými objemy zásobního roztoku standardu chloramfenikolu 200 μl , 400 μl , 600 μl . Změna objemu měřeného roztoku byla následně zahrnuta do výpočtu. Očekávaná koncentrace léčiva ve vzorku byla $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Kontrola stanovení obsahu chloramfenikolu ve vzorku léčiva byla provedena pomocí UV spektrometrie dle českého lékopisu.³ V lékopisu je stanovení obsahu popsáno následovně: 0,100 g se rozpustí ve vodě a zředí se na 500 ml. 10 ml tohoto roztoku se zředí vodou na 100 ml. Měří se absorbance v maximu při 278 nm. Vypočítá se obsah chloramfenikolu za použití specifické absorbance ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$), která má hodnotu 297 (cit.³). Stanovení obsahu bylo provedeno námi navrženým způsobem,

protože náš vzorek léčiva nebyl v pevném stavu, ale v kapalném stavu. Dle lékopisu byla vypočítána koncentrace vzorku léčiva po zředění, která byla $6,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Tato koncentrace byla určena k měření pomocí UV spektrometrie. Pro dosažení této koncentrace bylo odebráno do 10 ml baňky 40 μl roztoku očních kapek Spersadex a doplněno po rysku destilovanou vodou. Takto připravený roztok byl změřen pomocí UV spektrometrie při vlnové délce 278 nm a jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda. Absorbance naměřeného roztoku vzorku léčiva při vlnové délce 278 nm byla dosazena do uvedeného vzorce:

$$c = \frac{A}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot l}$$

kde c je získaná koncentrace vzorku léčiva v $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, A je naměřená absorbance vzorku léčiva a l je délka kyvety.

Vyhodnocení voltametrických křivek bylo odlišné dle použité techniky. Při diferenční pulzní voltametii byl potenciál odečten v lokálním maximu píku. Hodnota proudu byla odečtena od spojnice minim po stranách píku. U DC voltametrie byla při vyhodnocování vlny (někdy přecházející do tvaru píku) prodloužena lineární část záznamu před nástupem a po nástupu vlny. V polovině výšky vlny byl odečten půlvlnový potenciál. Hodnota proudu při tomto potenciálu byla odečtena mezi tečnami ke křivce vzniklých prodloužením lineární částí vlny. Při cyklické voltametii byl signál píku vyhodnocen jako u DC voltametrie dle výše popsaného postupu.

Mez stanovitelnosti byla vyhodnocena na základě výpočtu desetinasobku směrodatné odchylky proudu dvaceti opakovaných měření studované látky o koncentraci nejnižšího bodu kalibrační přímky.⁵³ V grafech jsou zobrazeny body jako aritmetický průměr pěti a více měřených křivek studované látky. Dále jsou zobrazeny chybové úsečky jako intervaly spolehlivosti na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. V některých případech byl pro zpracování naměřených dat použit Studentův test odlehlosti výsledků. Výše zmíněné statistické zpracování bylo prováděno pomocí výpočtů a funkcí v programu Excel MS Office.

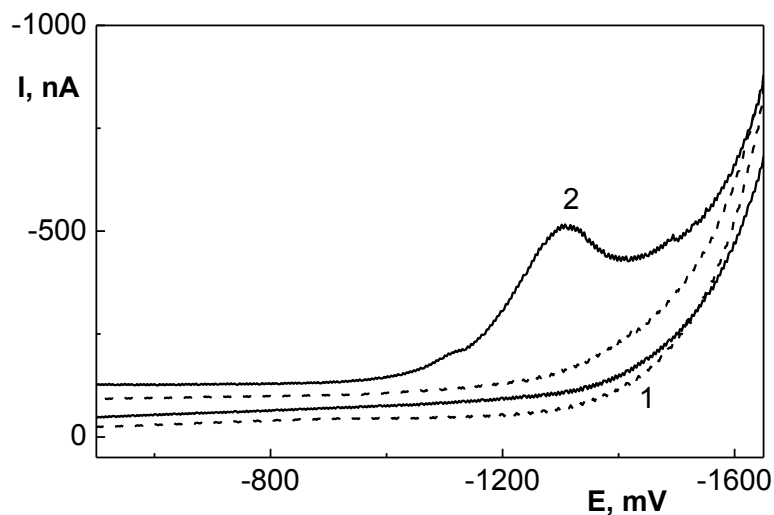
3 Voltametrické stanovení chlorambucilu na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě

3.1 Cyklická voltametrie

V prvním kroku byl chlorambucil studován pomocí cyklické voltametrie na visící rtuťové kapající elektrodě (HMDE). Při tomto měření bylo využito některých pracovních podmínek, které byly převzaty z již dříve publikované práce.⁴¹ Bylo využito stejného prostředí (acetátový pufr pH 5,4), pracovní elektrody, ale pro naše měření byla zvolena jiná koncentrace chlorambucilu. V původní práci pracovali s koncentrací chloramfenikolu $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, my jsme zvolili s ohledem na citlivost koncentraci chlorambucilu $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Cílem bylo ověření prostředí acetátového pufru o pH 5,4 a potenciálu redukčního píku $-1,3 \text{ V}$ (vs Ag/AgCl) chlorambucilu, jak bylo uvedeno v cit.⁴¹ a pokusit se použít tyto podmínky pro stanovení pomocí m-AgSAE.

V roztoku chlorambucilu o koncentraci $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí v methanolu a acetátového pufru o pH 5,4 v poměru 1:1 na HMDE, byly měřeny tři cykly v potenciálovém rozsahu od 0 mV do -1800 mV a zpět. Ve všech třech cyklech se objevil v první směru pík při potenciálu -1492 mV . Za stejných podmínek bylo měření provedeno na m-AgSAE, kde se však signál látky podařilo obtížně zachytit v okraji potenciálového okna při potenciálu -1535 mV . V porovnání s prací (cit.⁴¹) byl náš signál látky zachycen při významně zápornějším potenciálu. Mechanismus redukce chlorambucilu na HDME v práci (cit.⁴¹) nebyl objasněn a ani se nám nepodařilo jednoznačně navrhnout redukční mechanismus reakce odpovídající našemu signálu.

Chlorid draselný byl zvolen jako další možné prostředí pro stanovení chlorambucilu. V roztoku chlorambucilu o koncentraci $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v methanolu v prostředí chloridu draselného o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v poměru 1:1 na m-AgSAE, bylo měřeno pět cyklů v potenciálovém rozsahu od 100 mV do -1650 mV a zpět. Pět cyklů bylo prováděno proto, aby se systém dostal do ustáleného stavu. Ve všech pěti cyklech se objevil v prvním směru pík při potenciálu -1212 mV . Voltamogram posledního cyklu je uveden na obr. 3.1. Studovaná látka poskytovala v prostředí chloridu draselného dobře vyhodnotitelný signál.



Obrázek 3.1 Cyklický voltamogram chlorambucilu ($c = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) ve směsi methanol-0,2 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ chlorid draselný v poměru 1:1 (2) a základní elektrolyt (1). Měřeno na m-AgSAE.

3.2 Diferenční pulzní voltametrie

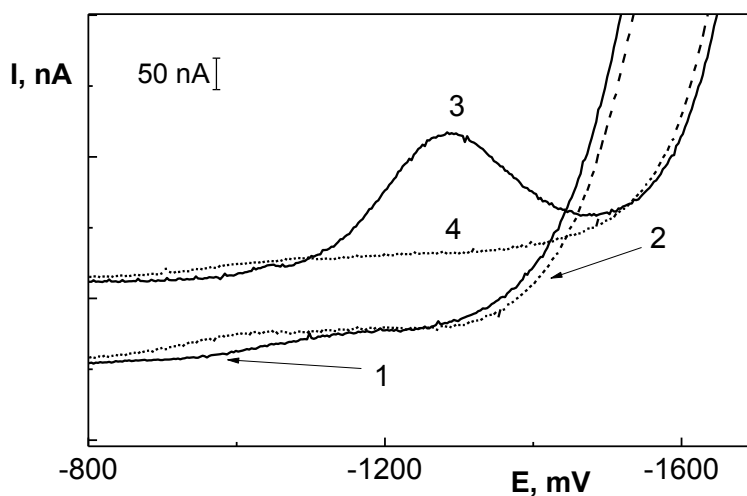
Technikou diferenční pulzní voltametrie byly hledány optimální podmínky pro stanovení na m-AgSAE. Byl sledován vliv pH na chování chlorambucilu v prostředí BR pufru o pH 2 až 12.

Při studiu vlivu pH na chování chlorambucilu ($c = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v prostředí BR pufru o hodnotě pH 2 až 12 a v metanolu (1:1) nebyl zaznamenán žádný signál studované látky. Pomocí DPV roztok chlorambucilu o koncentraci $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v methanolu v prostředí chloridu draselného v poměru 1:1 poskytoval jeden pík při potenciálu -1284 mV . Proto pro další měření chlorambucilu byla zvolena směs methanolu a chloridu draselného ($c = 0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) jako optimální prostředí. Na obr. 3.2 je znázorněn DP voltamogram chlorambucilu ($c = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) ve směsi BR pufru o pH 7 a methanol v poměru 1:1 a ve směsi methanol-chlorid draselný ($c = 0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v poměru 1:1.

V dalším kroku měření DPV byla studována stálost signálu chlorambucilu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) ve směsi methanol-chlorid draselný ($c = 0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v poměru 1:1. Nejprve byla studovaná látka měřena bez regenerace a následně s regeneračními

potenciály $E_{\text{reg1}} = -100 \text{ mV}$ a $E_{\text{reg2}} = -1650 \text{ mV}$, po té s potenciály $E_{\text{reg1}} = -200 \text{ mV}$ a $E_{\text{reg2}} = -1650 \text{ mV}$, dále s potenciály $E_{\text{reg1}} = -200 \text{ mV}$ a $E_{\text{reg2}} = -2300$ a v poslední řadě s potenciály $E_{\text{reg1}} = -200 \text{ mV}$ a $E_{\text{reg2}} = -2500 \text{ mV}$. Při opakovaném měření bez regenerace docházelo ke zmenšení signálu a k posunu píku na ose ve směru zápornějších potenciálů. S vloženými regeneračními potenciály byl signál látky poněkud neostrý až rozmytý. Také docházelo k posunu píku na ose ve směru zápornějších potenciálů. Signál látky se po měření často obtížně dostával do původního stavu, proto bylo nutné opakovat amalgamací elektrody.

Závěrem je nutno konstatovat, že nebyly nalezeny vhodné podmínky pro stanovení chlorambucilu na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě. Byly sice nalezeny podmínky, za nichž tato látka poskytovala voltametrické píky, ale stabilita a opakovatelnost signálu byla nízká, proto se jevila jako nevhodná pro analytické stanovení.



Obrázek 3.2 DP voltamogram chlorambucilu ($c = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) ve směsi BR pufr o pH 7 a methanol v poměru 1:1 (1) a základní elektrolyt (2) spolu s DP voltamogramem chlorambucilu ($c = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) ve směsi methanol-0,2 mol \cdot l $^{-1}$ chlorid draselný v poměru 1:1 (3) a základní elektrolyt (4). Měřeno na m-AgSAE, rychlost skenu 20 mV \cdot s $^{-1}$.

4 Voltametrické stanovení chloramfenikolu na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě

4.1 DC Voltametrie

4.1.1 Vliv pH

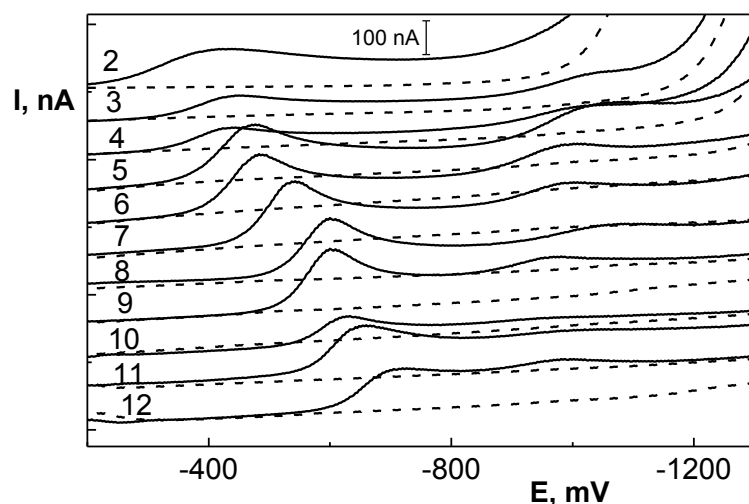
Vliv pH na chování chloramfenikolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) při DCV na m-AgSAE byl sledován v prostředí BR pufru o příslušném pH v rozmezí hodnot 2 – 12. Látka poskytovala jednu vlnu při pH 2. V rozmezí pH od 3 až 12 byly zaznamenány dvě vlny, z nichž první měla strmější nárůst a byla vyšší. Výsledné zaznamenané voltametrické křivky jsou na obr. 4.1. Půlvalnový potenciál první vlny lineárně klesal s rostoucím pH hodnot od 2 až po 12, jak je vidět na obr. 4.2.

Metodou lineární regrese byl pro závislost půlvalnového potenciálu $E_{1/2}$ na pH v roztoku BR pufru v rozmezí 2 – 12 vypočten vztah:

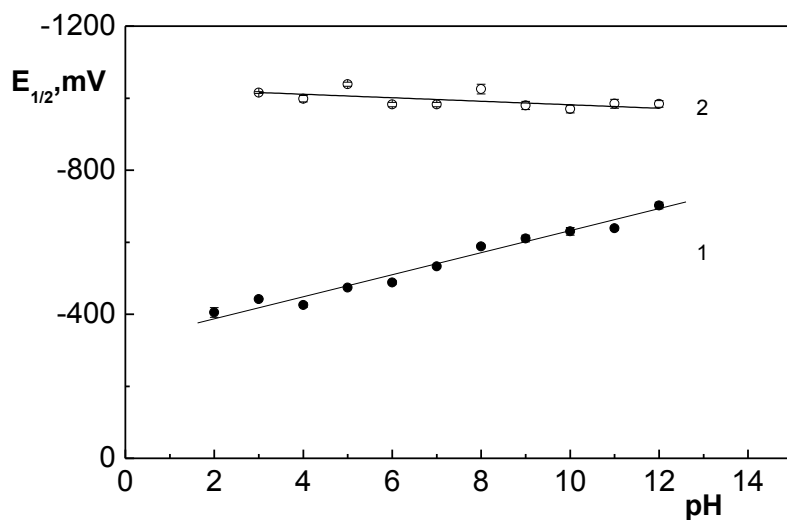
$$E_{1/2} \text{ (mV)} = -29,6 \text{ pH} - 332,4 \quad (\text{korelační koeficient } -0,9854)$$

Potenciál druhé vlny se s rostoucím pH v podstatě neměnil. Grafické znázornění závislosti půlvalnových potenciálů $E_{1/2}$ a proudů vln I_v na pH je znázorněno na obr. 4.2 a 4.3.

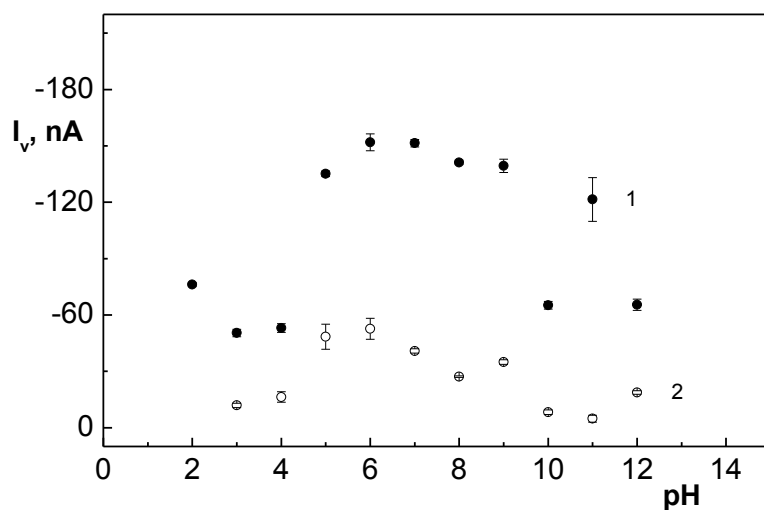
Optimálním prostředím byl zvolen BR pufr o hodnotě pH 7, kde chloramfenikol poskytoval nejlépe vyhodnotitelnou vlnu s nejvyšší opakovatelností její výšky. Při tomto zvoleném prostředí byla provedena opakovaná měření bez a s regeneračními potenciály $E_{\text{reg1}} = 0 \text{ mV}$ a $E_{\text{reg2}} = -1800 \text{ mV}$. Graficky je průběh regenerace znázorněn závislostí proudu vlny I_v na pořadovém čísle měření N na obr. 4.4. Ze závislosti je vidět, že vývoj proudu vlny je klesající při vložení regeneračních potenciálů. Při regeneraci byla zjištěna $\text{RSD} = 10,5 \%$ a bez regenerace byla hodnota $\text{RSD} = 2,4 \%$.



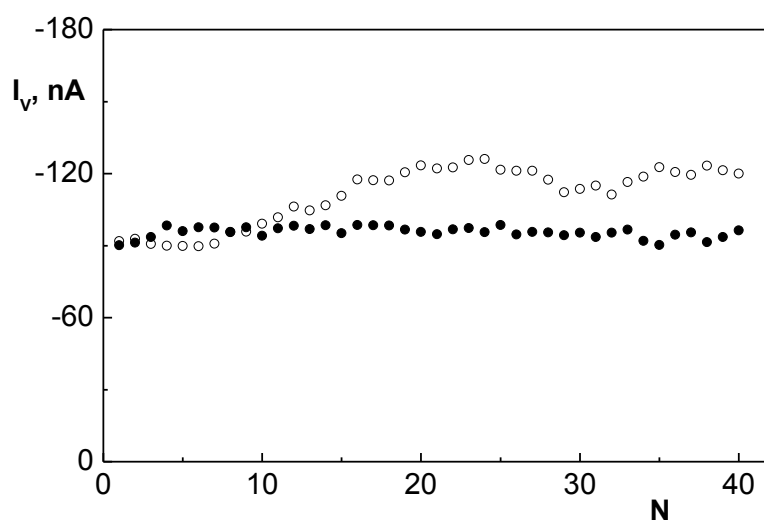
Obrázek 4.1 Voltamogramy chloramfenikolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřené technikou DCV na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí RB pufru o pH 2 – 12. Hodnoty pH pufrů odpovídají číslům křivek v grafu.



Obrázek 4.2 Závislost půlnového potenciálu $E_{1/2}$ chloramfenikolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH roztoku. Měřeno technikou DCV na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí RB pufru o pH 2 – 12, první pik (1 – ●), druhý pik (2 – ○).



Obrázek 4.3 Závislost proudu vlny I_v chloramfenikolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH roztoku. Měřeno technikou DCV na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí RB pufru, první pík (1 – ●), druhý pík (2 – ○).

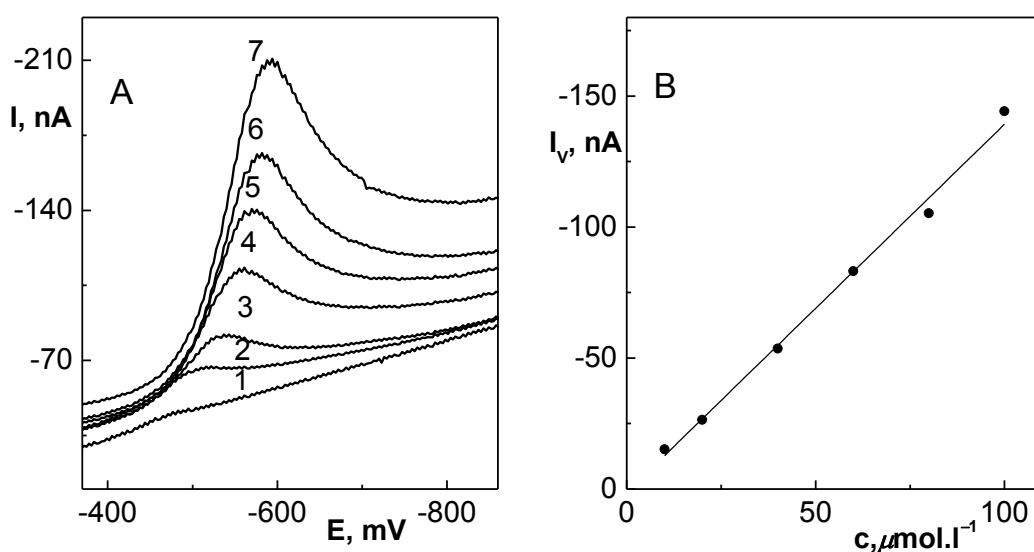


Obrázek 4.4 Závislost proudu vlny I_v chloramfenikolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pořadovém čísle měření (N) v prostředí BR pufru o pH 7, měřeno technikou DCV na $m\text{-AgSAE}$. S regenerací ○ – $E_{reg1} = -1800 \text{ mV}$ a $E_{reg2} = 0 \text{ mV}$, ● – bez regenerace.

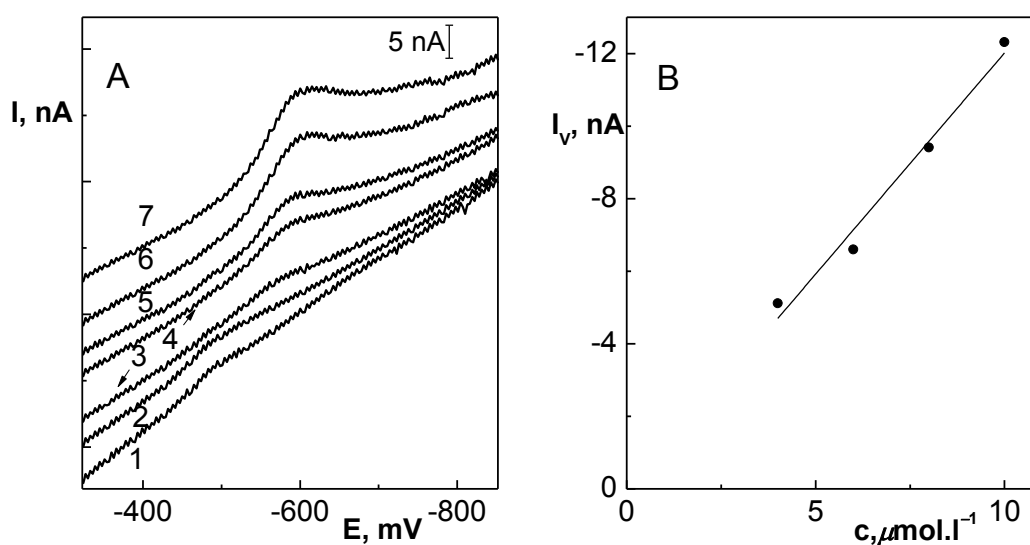
4.1.2 Kalibrační závislosti

V prostředí BR pufru o pH 7 byly proměřeny kalibrační závislosti chloramfenikolu v koncentračním rozmezí od $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ až po $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ metodou DCV na m-AgSAE. Naměřené kalibrační závislosti byly v celém koncentračním rozsahu lineární. Graficky jsou výsledné DC voltamogramy chloramfenikolu zobrazeny na obr. 4.5 (A) pro koncentrace v rozsahu $(1 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a na obr. 4.6 (A) pro $(1 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Závislost výšky vlny I_v na koncentraci chloramfenikolu v rozmezí $(1 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ je znázorněna na obr. 4.5 (B) a pro koncentrační rozmezí $(4 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na obr. 4.6 (B). Parametry kalibračních závislostí a mez stanovitelnosti jsou uvedeny v tab. 4.2.

Pro kontrolu opakovatelnosti výšky vlny a určení meze stanovitelnosti za daných podmínek byla provedena opakovaná měření voltamogramů při nejnižší dosažené koncentraci $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (RSD = 5,0 %). Dosažená mez stanovitelnosti byla $2,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obrázek 4.5 Voltamogramy chloramfenikolu měřené technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7. c (CAP): 0 (1), 10 (2), 20 (3), 40 (4), 60 (5), 80 (6), 100 (7) $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (A). Závislost proudu vlny na koncentraci CAP v rozmezí 10 – 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. (B)



Obrázek 4.6 Voltamogramy chloramfenikolu měřené technikou DCV na *m*-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7, *c* (CAP): 0 (1), 1 (2), 2 (3), 4 (4), 6 (5), 8 (6), 10 (7) μmol·l⁻¹ (A). Závislost proudu vlny na koncentraci CAP v rozmezí 4 – 10 μmol·l⁻¹. (B)

Tabulka 4.2 Parametry kalibračních přímek pro stanovení chloramfenikolu metodou DCV na *m*-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7.

koncentrace [mol·l ⁻¹]	úsek [nA]	směrnice [nA·mol ⁻¹ ·l]	korelační koeficient	LOQ [mol·l ⁻¹]
(1 – 10)·10 ⁻⁵	0,18	-1,22·10 ⁶	-0,9903	–
(1 – 10)·10 ⁻⁶	1,27	-1,40·10 ⁶	-0,9972	2,3·10 ⁻⁶

4.2 Diferenční pulzní voltametrie

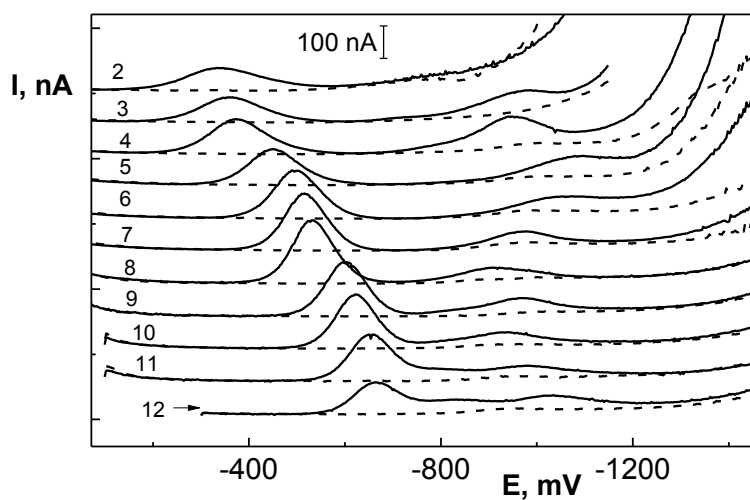
4.2.1 Vliv pH

Vliv pH na chování chloramfenikolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) při DPV na m-AgSAE byl sledován v prostředí BR pufru o příslušném pH v rozmezí hodnot 2 – 12. Látka poskytovala jeden pík při pH 2. V rozmezí pH od 3 až 12 byly zaznamenány dva píky, z nichž první byl vyšší a měl ostřejší tvar. Výsledné zaznamenané voltametrické křivky jsou na obr. 4.7. Potenciál DPV píků lineárně klesal v rostoucím pH hodnot od 2 až po 12, jak je vidět na obr. 4.8.

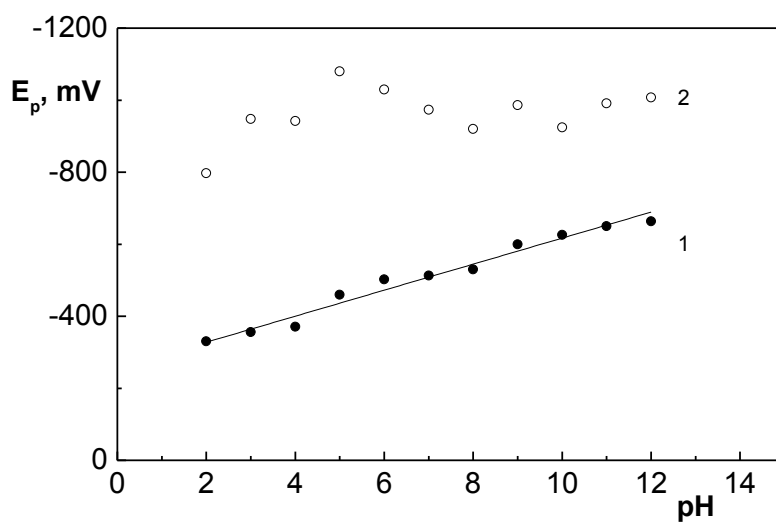
Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu prvního píku E_p na pH v roztoku BR pufru v rozmezí 2 – 12 vypočten vztah:

$$E_p \text{ (mV)} = -35,6 \text{ pH} - 260,0 \quad (\text{korlační koeficient } -0,9871)$$

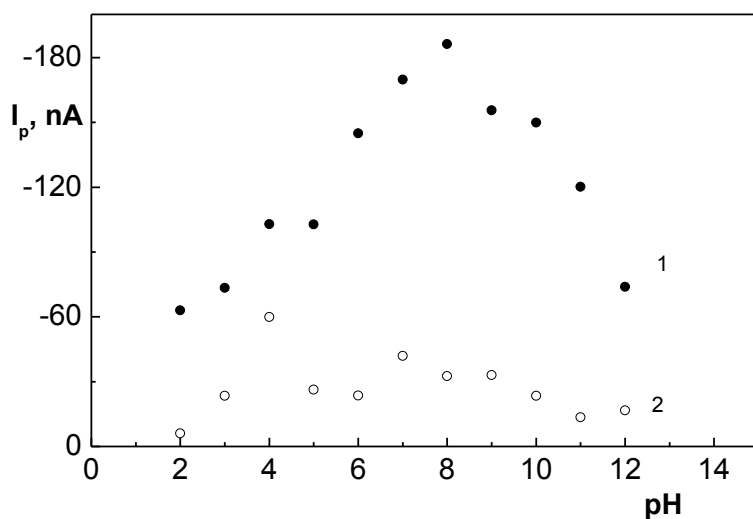
Potenciál druhého píku se s rostoucím pH v podstatě neměnil. Grafické znázornění závislosti potenciálů píků E_p a proudů píků I_p na pH je znázorněno na obr. 4.8 a 4.9. Optimálním prostředím byl zvolen BR pufr o hodnotě pH 8, kde chloramfenikol poskytoval nejvyšší a nejlépe vyhodnotitelnou vlnu. Při tomto zvoleném prostředí byla provedena opakovaná měření chloramfenikolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) bez regenerace (RSD = 4,1 %) a s regeneračními potenciály $E_{\text{reg1}} = 0 \text{ mV}$ a $E_{\text{reg2}} = -1800 \text{ mV}$ (RSD = 3,7 %), $E_{\text{reg1}} = 0 \text{ mV}$ a $E_{\text{reg2}} = -1900 \text{ mV}$ (RSD = 1,6 %), $E_{\text{reg1}} = 0 \text{ mV}$ a $E_{\text{reg2}} = -2000 \text{ mV}$ (RSD = 4,9 %). Opakovatelnost signálu byla ověřena při nejnižší koncentraci chloramfenikolu ($c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) bez regenerace (RSD = 5,6 %) a s regenerací $E_{\text{reg1}} = 0 \text{ mV}$ a $E_{\text{reg2}} = -1900 \text{ mV}$ (RSD = 8,8 %). Graficky jsou průběhy regenerací znázorněny závislostí proudů píků I_p na pořadovém čísle měření N na obr. 4.10. Ze závislostí je vidět, že vývoj proudů píků I_p je stabilnější a citlivější bez vložení regeneračních potenciálů, proto byla další měření prováděna bez regenerace.



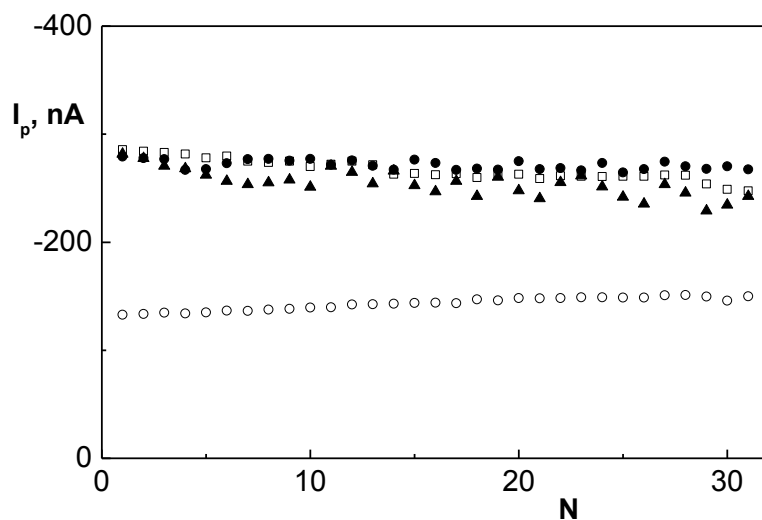
Obrázek 4.7 Voltamogramy chloramfenikolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřené technikou DPV na *m*-AgSAE v prostředí RB pufru o pH 2 – 12. Hodnoty pH pufrů odpovídají číslům křivek v grafu.



Obrázek 4.8 Závislost potenciálu píku E_p chloramfenikolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH roztoku. Měřeno technikou DPV na *m*-AgSAE v prostředí RB pufru o pH 2 – 12, první pik (1 – ●), druhý pik (2 – ○).



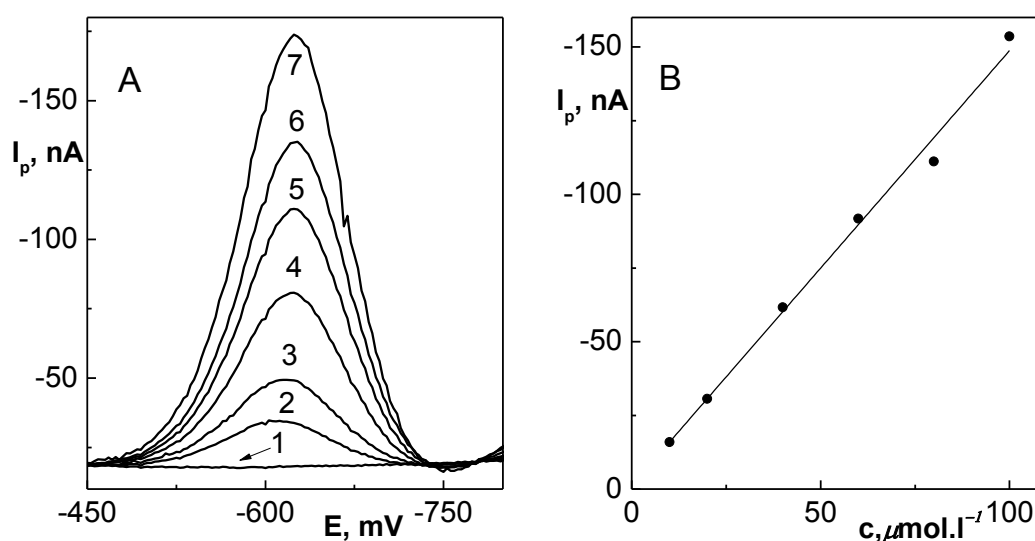
Obrázek 4.9 Závislost proudu píku I_p chloramfenikolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pH roztoku. Měřeno technikou DPV na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí RB pufru, první pík (1 – ●), druhý pík (2 – ○).



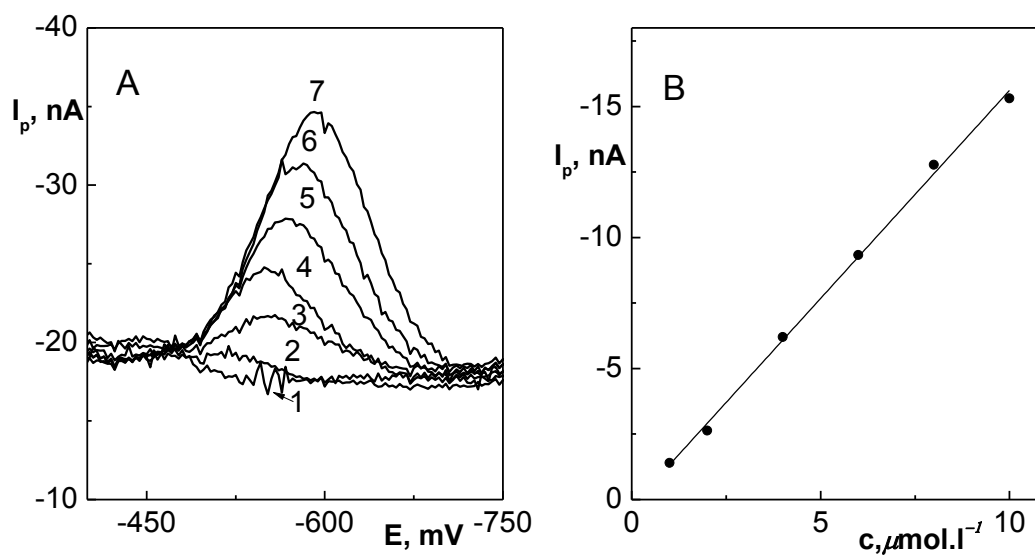
Obrázek 4.10 Závislost proudu píku I_p chloramfenikolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na pořadovém čísle měření (N) v prostředí BR pufru o pH 8, měřeno technikou DPV na $m\text{-AgSAE}$. S regenerací □ – $E_{reg1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{reg2} = -1800 \text{ mV}$, ● – $E_{reg1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{reg2} = -1900 \text{ mV}$, ▲ – $E_{reg1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{reg2} = -2000 \text{ mV}$, ○ – bez regenerace

4.2.2 Kalibrační závislosti

V prostředí BR pufru o pH 8 byly proměřeny kalibrační závislosti chloramfenikolu v koncentračním rozmezí od $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ až po $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ metodou DPV na m-AgSAE. Naměřené kalibrační závislosti byly v celém svém koncentračním rozsahu lineární. Graficky jsou výsledné DP voltamogramy chloramfenikolu zobrazeny na obr. 4.11 (A) v koncentračním rozsahu $(1 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a pro $(1 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na obr. 4.12 (A). Závislost proudu píku I_p na koncentraci chloramfenikolu v rozmezí $(1 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ je znárodněna na obr. 4.11 (B) a pro koncentrační rozmezí $(1 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na obr. 4.12 (B). Parametry kalibračních závislostí a mez stanovitelnosti jsou uvedeny v tab. 4.4. Pro kontrolu opakovatelnosti výšky píku za daných podmínek byla provedena opakovaná měření voltamogramů při nejnižší dosažené koncentraci $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (RSD = 6,0 %). Dosažená mez stanovitelnosti byla $2,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obrázek 4.11 Voltamogramy chloramfenikolu měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 8. c (CAP): 0 (1), 10 (2), 20 (3), 40 (4), 60 (5), 80 (6), 100 (7) $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (A). Závislost proudu píku na koncentraci CAP v rozmezí 10 – 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. (B)



Obrázek 4.12 Voltamogramy chloramfenikolu měřené technikou DPV na *m*-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 8. *c* (CAP): 0 (1), 1 (2), 2 (3), 4 (4), 6 (5), 8 (6), 10 (7) $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (A). Závislost proudu piku na koncentraci CAP v rozmezí 1 – 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. (B)

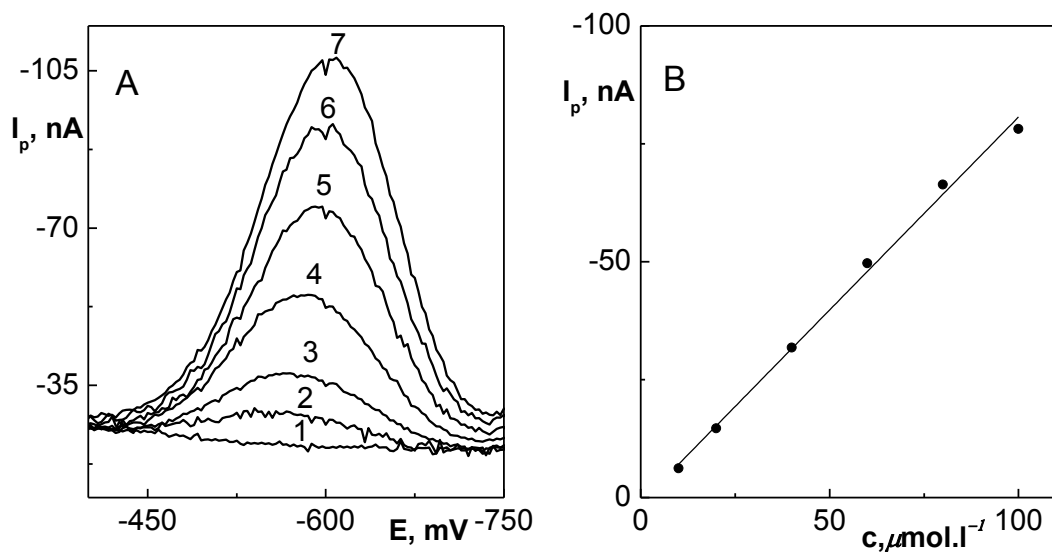
Tabulka 4.4 Parametry kalibračních přímek pro stanovení chloramfenikolu metodou DPV na *m*-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 8.

koncentrace [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	úsek [nA]	směrnice [$\text{nA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$]	korelační koeficient	LOQ [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]
$(1 - 10)\cdot 10^{-5}$	-1,15	$-1,48\cdot 10^6$	-0,9964	-
$(1 - 10)\cdot 10^{-6}$	0,26	$-1,59\cdot 10^6$	-0,9999	$2,1\cdot 10^{-6}$

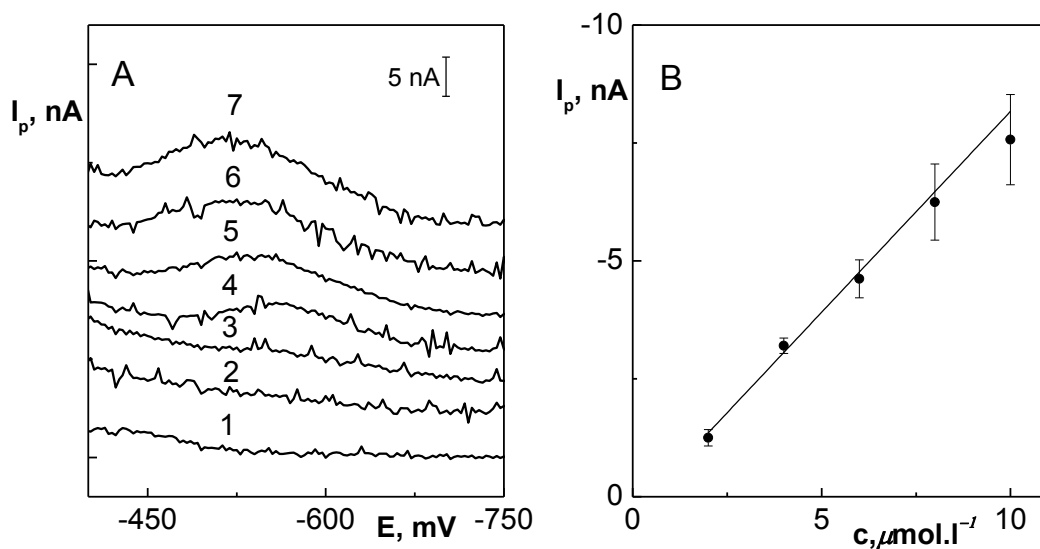
4.2.3 Stanovení chloramfenikolu v pitné a říční vodě pomocí diferenční pulzní voltametrie

Pro stanovení chloramfenikolu v reálných matricích na m-AgSAE byla zvolena metoda diferenční pulzní voltametrie, protože byla citlivější a signál byl obecně lépe vyhodnotitelný. Jako příklady jednoduchých reálných matricí byla zvolena pitná a říční voda.

Kalibrační závislost chloramfenikolu v pitné vodě byla proměřena DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 8, v koncentračním rozmezí měřeného roztoku od $1 \cdot 10^{-6}$ až po $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Graficky jsou výsledné DP voltamogramy chloramfenikolu v pitné vodě zobrazeny na obr. 4.13 (A) pro koncentrační rozsah $(1 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a pro $(1 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na obr. 4.14 (A). Závislost proudu píku I_p na koncentraci chloramfenikolu v rozmezí $(1 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ je znárodněna na obr. 4.13 (B) a pro koncentrační rozmezí $(1 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na obr. 4.14 (B). Koncentrační závislosti byly v celém svém měřeném rozsahu lineární. Parametry kalibračních závislostí a mez stanovitelnosti jsou uvedeny v tab. 4.5. Výsledné hodnoty směrnice u stanovení v pitné vodě byly pro obě koncentrační rozmezí větší než výsledné směrnice u stanovení v říční vodě. To může být způsobeno vlivem matrice, ale stanovení také nebylo měřeno na identickém povrchu pracovní elektrody. Dosažená mez stanovitelnosti v pitné vodě byla $4,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Obrázek 4.13 Voltamogramy chloramfenikolu v pitné vodě a BR pufru o pH 8 v poměru 9:1 měřené technikou DPV na *m*-AgSAE. *c* (CAP): 0 (1), 10 (2), 20 (3), 40 (4), 60 (5), 80 (6), 100 (7) $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (A). Závislost proudu píku na koncentraci CAP v rozmezí 10 – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. (B)

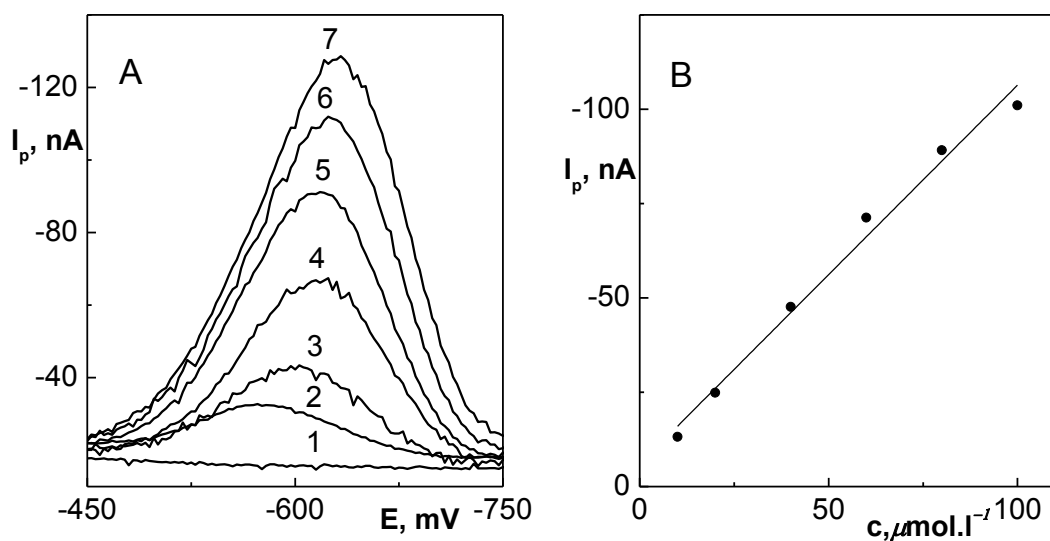


Obrázek 4.14 Voltamogramy chloramfenikolu v pitné vodě a BR pufru o pH 8 v poměru 9:1 měřené technikou DPV na *m*-AgSAE. *c* (CAP): 0 (1), 1 (2), 2 (3), 4 (4), 6 (5), 8 (6), 10 (7) $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (A). Závislost proudu píku na koncentraci CAP v rozmezí 1 – 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. (B)

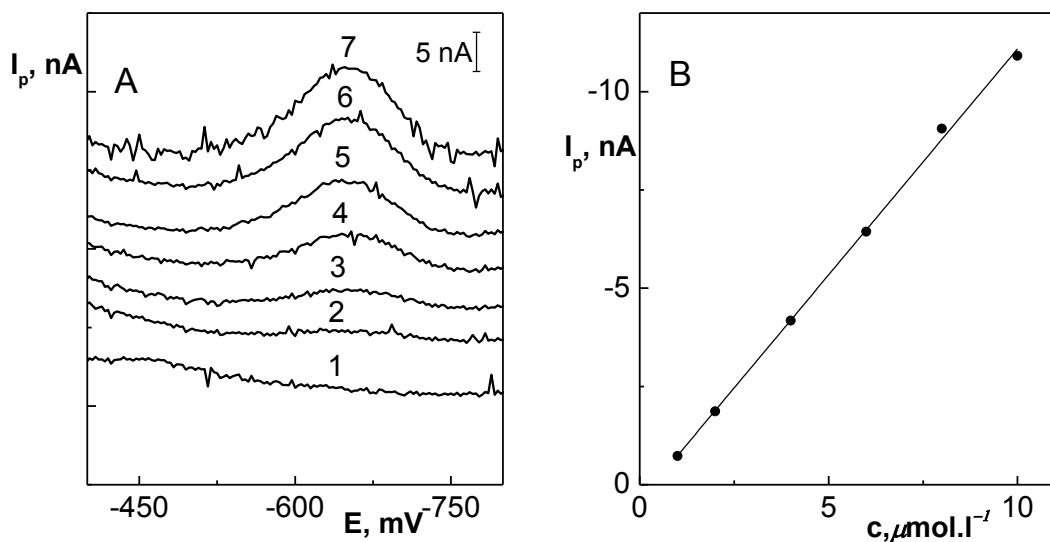
Kalibrační závislost chloramfenikolu v říční vodě byla proměřena DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 8, v koncentračním rozmezí měřeného roztoku od $1 \cdot 10^{-6}$ až po $1 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot l $^{-1}$. Graficky jsou výsledné DP voltamogramy chloramfenikolu v říční vodě zobrazeny na obr. 4.15 (A) pro koncentrační rozsah $(1 - 10) \cdot 10^{-5}$ mol \cdot l $^{-1}$ a pro $(1 - 10) \cdot 10^{-6}$ mol \cdot l $^{-1}$ na obr. 4.16 (A). Závislost proudu píku I_p na koncentraci chloramfenikolu v rozmezí $(1 - 10) \cdot 10^{-5}$ mol \cdot l $^{-1}$ je znázorněna na obr. 4.15 (B) a pro koncentrační rozmezí $(1 - 10) \cdot 10^{-6}$ mol \cdot l $^{-1}$ na obr. 4.16 (B). Koncentrační závislosti byly v celém svém měřeném rozsahu lineární. Parametry kalibračních závislostí a mez stanovitelnosti jsou uvedeny v tab. 4.5. Dosažená mez stanovitelnosti v říční vodě byla $2,9 \cdot 10^{-6}$ mol \cdot l $^{-1}$.

Tabulka 4.5 Parametry kalibračních přímek pro stanovení chloramfenikolu v říční a pitné vodě metodou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 8.

Pitná voda				
koncentrace [mol \cdot l $^{-1}$]	úsek [nA]	směrnice [nA \cdot mol $^{-1}$]	korelační koeficient	LOQ [mol \cdot l $^{-1}$]
$(1 - 10) \cdot 10^{-5}$	1,14	$-8,18 \cdot 10^5$	-0,9982	-
$(1 - 10) \cdot 10^{-6}$	0,13	$-7,84 \cdot 10^5$	-0,9979	$4,2 \cdot 10^{-6}$
Říční voda				
koncentrace [mol \cdot l $^{-1}$]	úsek [nA]	směrnice [nA \cdot mol $^{-1}$]	korelační koeficient	LOQ [mol \cdot l $^{-1}$]
$(1 - 10) \cdot 10^{-5}$	-5,95	$-1,00 \cdot 10^6$	-0,9940	-
$(1 - 10) \cdot 10^{-6}$	0,41	$-1,15 \cdot 10^6$	-0,9993	$2,9 \cdot 10^{-6}$



Obrázek 4.15 Voltamogramy chloramfenikolu v říční vodě a BR pufru o pH v poměru 9:1 měřené technikou DPV na *m*-AgSAE. *c* (CAP): 0 (1), 10 (2), 20 (3), 40 (4), 60 (5), 80 (6), 100 (7) $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (A). Závislost proudu píku na koncentraci chloramfenikolu v rozmezí 10 – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. (B)

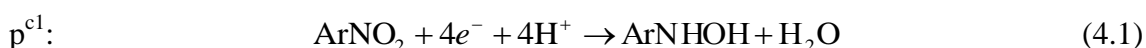


Obrázek 4.16 Voltamogramy chloramfenikolu v říční vodě a BR pufru o pH v poměru 9:1 měřené technikou DPV na *m*-AgSAE. *c* (CAP): 0 (1), 1 (2), 2 (3), 4 (4), 6 (5), 8 (6), 10 (7) $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (A). Závislost proudu píku na koncentraci CAP v rozmezí 1 – 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. (B)

4.3 Cyklická voltametrie

Chloramfenikol o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl studován pomocí cyklické voltametrie na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 2, 6, 8 a 10 při rychlosti polarizace $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Zaznamenáno bylo pět cyklů, aby se systém dostal do ustáleného stavu. Měření byla prováděna bez regenerace. Naměřené voltamogramy pro jednotlivá pH 2, 6, 8, 10 jsou na obr. 4.17, 4.18, 4.19 a 4.20. Následující popis redukce chloramfenikolu na m-AgSAE byl navržen a popsán dle dostupné literatury zabývající se problematikou mechanismu redukci aromatických nitrosloúčenin ve vodných roztocích.⁵⁴⁻⁵⁶ Další převzaté mechanismy vycházejí z popisu elektrochemického chování podobných sloučenin na rtuťových elektrodách^{57,58} a také na pevných stříbrných amalgámových elektrodách.^{52,59}

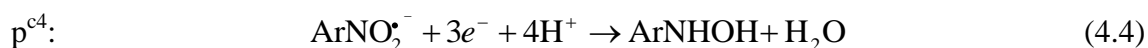
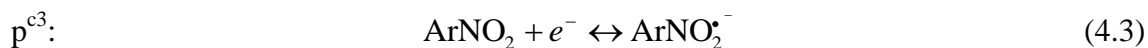
V prostředí BR pufru o pH 2 je dobře patrný jeden katodický pík p^{c1} ($E_{1/2} = -367 \text{ mV}$), který pravděpodobně odpovídá čtyřelektronové redukci nitro skupiny (ArNO_2) na hydroxylamino skupinu (ArNHOH) (cit. ^{52,56,57,59}) dle rovnice (4.1):



V prostředí BR pufru o pH 6 jsou dobře rozpoznatelné dva katodické píky p^{c1} ($E_{1/2} = -393 \text{ mV}$) a p^{c2} ($E_{1/2} = -922 \text{ mV}$), kde pík p^{c1} pravděpodobně odpovídá opět čtyřelektronové redukci dle rovnice (4.1) a pík p^{c2} pravděpodobně odpovídá následné dvouelektronové redukci hydroxylamino skupiny (ArNHON) na amino skupinu (ArNH_2) (cit. ^{52,56,57,59}) dle rovnice (4.2):



V prostředí BR pufru o pH 8 se v prvním skenu objevily dva katodické píky p^{c3} ($E_{1/2} = -592 \text{ mV}$), p^{c4} ($E_{1/2} = -1051 \text{ mV}$) a při dalších skenech vzniká katodický pík p^{c5} ($E_{1/2} = -98 \text{ mV}$). Dále se objevuje jeden anodický pík p^{a1} ($E_{1/2} = -132 \text{ mV}$), který vzniká při zpětném skenu. Katodický pík p^{c3} pravděpodobně odpovídá jedoelektronové redukci nitro skupiny (ArNO_2) za vzniku radikálu ($\text{ArNO}_2^{\cdot-}$) dle rovnice (4.3). Následující katodický pík p^{c4} pravděpodobně odpovídá tříelektronové redukci vzniklého radikálu ($\text{ArNO}_2^{\cdot-}$) na hydroxylamino skupinu (ArNHOH) (cit. ^{52,56-59}) dle rovnice (4.4).

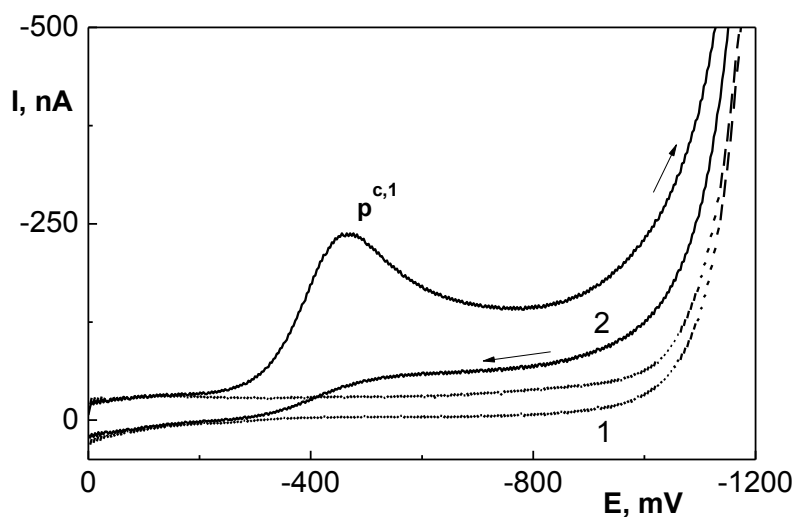


Anodický pík p^{a1} ve zpětném skenu pravděpodobně odpovídá dvouelektronové reverzibilní oxidaci hydroxylamino skupiny (ArNHOH) za vzniku nitroso skupiny (ArNO) dle rovnice (4.5). Katodický pík p^{c5} vzniká zpětnou reakcí rovnice (4.5).

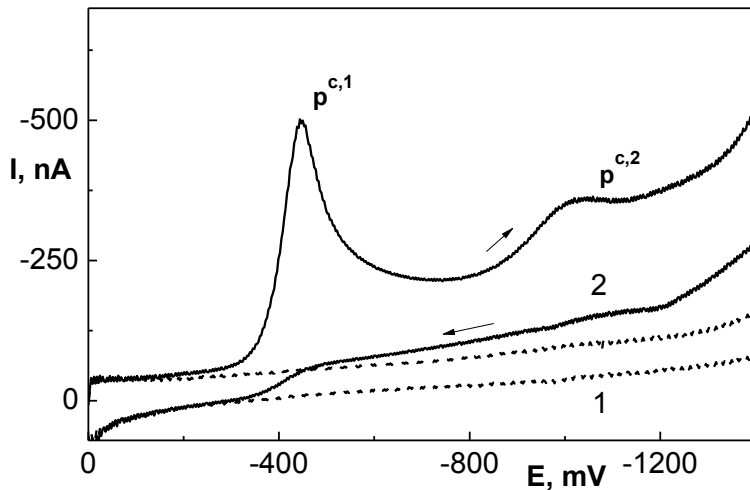


V prostředí BR pufru o pH 12 vznikají dva katodické píky p^{c3} ($E_{1/2} = -664$ mV) a p^{c4} ($E_{1/2} = -888$ mV), v dalších skenech pak katodický pík p^{c5} ($E_{1/2} = -318$ mV), v reverzním skenu se objevuje jeden anodický pík p^{a1} ($E_{1/2} = -343$ mV). Katodické píky p^{c3} a p^{c4} pravděpodobně odpovídají jedné a tříelektronové redukci dle rovnic (4.3) a (4.4). Anodický pík p^{a1} odpovídá dvouelektrodové reverzibilní oxidaci dle rovnice (4.5) a katodický pík p^{c5} vzniká zpětnou reakcí rovnice (4.5). Dále se zde objevuje další katodický pík p^{c6} ($E_{1/2} = -1156$ mV), který nebyl popsán žádným reakčním mechanismem v dostupné literatuře.

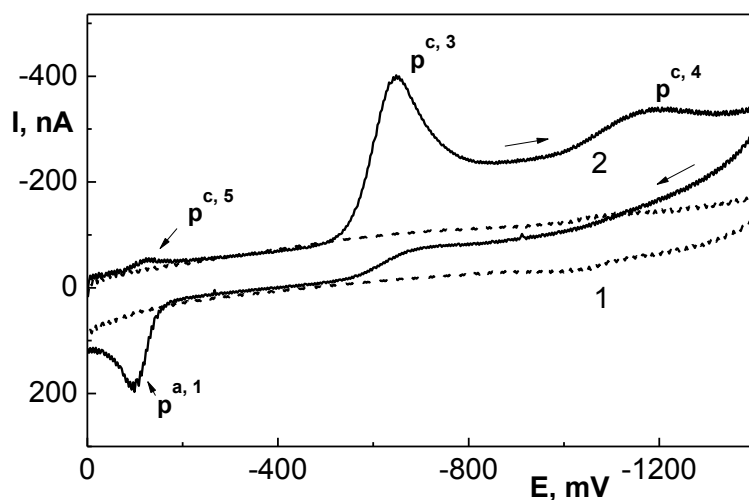
Byly měřeny cyklické voltamogramy chloramfenikolu ($1 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot l $^{-1}$) na m-AgSAE při různých rychlostech polarizace v rozmezí 25 až 300 mV \cdot s $^{-1}$ v prostředí BR pufru o pH 2, 6, 8, 12. Graficky je závislost proudu píku na odmocnině rychlosti polarizace ($v^{1/2}$) pro pH 2, 6, 8 a 12 znázorněna na obr. 4.21 (A – D). Z uvedených závislostí je vidět, že proudy píků jsou lineárně závislé na odmocnině rychlosti polarizace ($v^{1/2}$), tedy elektrochemické reakce studované látky jsou řízeny difúzí. Parametry lineárních závislostí proudů píků na odmocnině rychlosti polarizace a rychlosti polarizace jsou uvedeny v tab. 4.6.



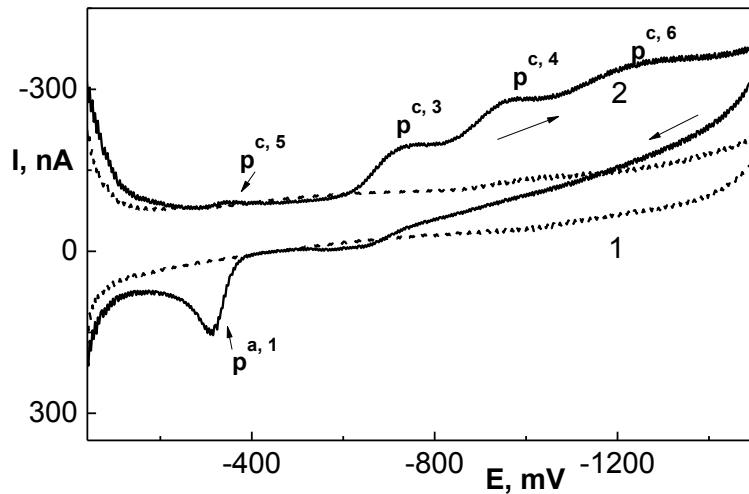
Obrázek 4.17 Cyklický voltamogram chloramfenikolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřený technikou CV na *m*-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 2 (2) a základní elektrolyt (1). Měřeno ve směru od 0 mV k -1200 mV a zpět, rychlost skenu $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



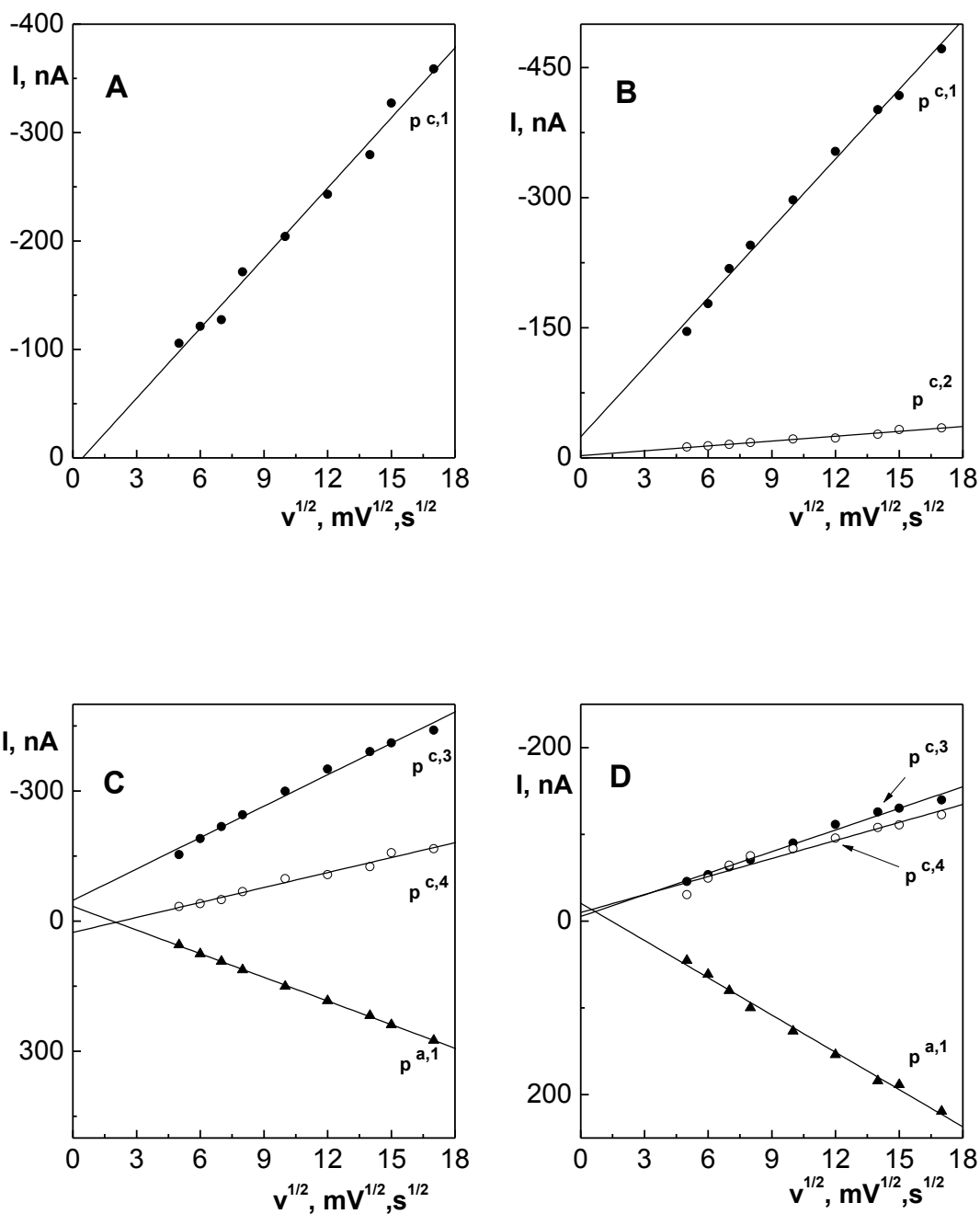
Obrázek 4.18 Cyklický voltamogram chloramfenikolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřený technikou CV na *m*-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 6 (2) a základní elektrolyt (1). Měřeno ve směru od 0 mV k -1700 mV a zpět, rychlost skenu $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



Obrázek 4.19 Cyklický voltamogram chloramfenikolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřený technikou CV na *m*-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 8 (2) a základní elektrolyt (1). Měřeno ve směru od 0 mV k -1700 mV a zpět, rychlost skenu $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



Obrázek 4.20 Cyklický voltamogram chloramfenikolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřený technikou CV na *m*-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 12 (2) a základní elektrolyt (1). Měřeno ve směru od 0 mV k -1800 mV a zpět, rychlost skenu $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



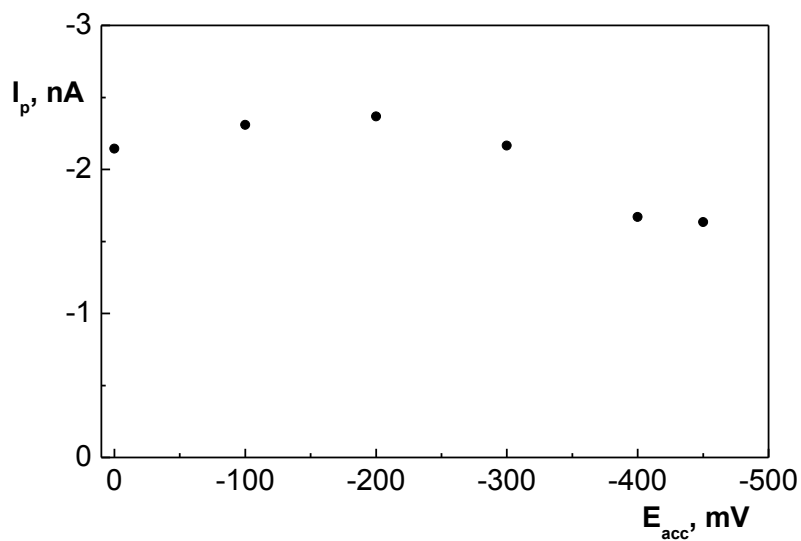
Obrázek 4.21 Závislost katodických a anodických píků chloramfenikolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na odmocnině rychlosti polarizace ($v^{1/2}$), měřeno cyklickou voltametrií na *m*-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 2 (A), pH 6 (B), pH 8 (C), pH 12 (D)

Tabulka 4.6 Parametry lineárních závislostí proudů katodických a anodických píků chloramfenikolu ($1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na rychlosti polarizace a odmocnině rychlosti polarizace

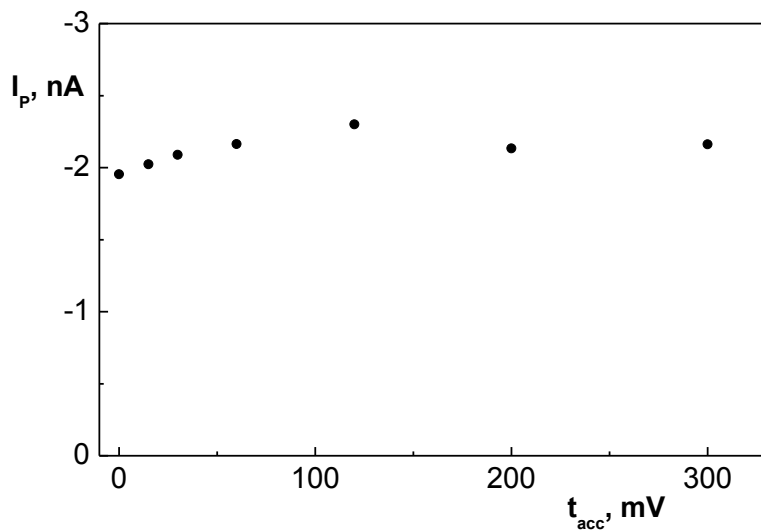
pH	p^c a p^a , $E_{1/2}$ [mV]	směrnice [nA·mV ^{1/2} ·s ^{1/2}]	úsek [nA]	korelační koeficient	směrnice [nA·mV·s]	úsek [nA]	korelační koeficient
2	p^{c1} -367	-21,6	9,7	-0,9948	-0,9	-92,8	-0,9898
6	p^{c1} -393	-26,7	-24,3	-0,9976	-1,2	-153,4	-0,9791
	p^{c2} -922	-1,9	-2,6	-0,9885	-0,1	-11,4	-0,9880
8	p^{c3} -592	-24,1	-47,7	-0,9948	-1,1	-165,3	-0,9705
	p^{c4} -1051	-11,5	26,0	-0,9910	-0,5	-29,1	-0,9799
	p^{a1} -132	18,2	-34,0	0,9998	0,8	-53,1	0,9887
12	p^{c3} -664	-8,3	-5,4	-0,9942	-0,4	-45,7	-0,9722
	p^{c4} -888	-6,9	-9,8	-0,9728	-0,3	-44,0	-0,9375
	p^{a1} -343	14,3	-20,7	0,9972	0,6	48,6	0,9785

4.4 Adsorpční rozpouštěcí voltametrie

Adsorpční rozpouštěcí voltametrie byla použita v prostředí BR pufru o pH 8, který byl zvolen jako optimální prostředí pro DPV. Koncentrace chloramfenikolu byla $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Byl zjišťován vliv potenciálu akumulace na výšku píku chloramfenikolu v rozmezí od 0 mV do 450 mV, graficky je tato závislost znázorněna na obr. 4.22. Při akumulaci byl roztok míchán a doba akumulace byla 60 s. Jako optimální hodnota potenciálu akumulace byla zvolena $E_{acc} = -300 \text{ mV}$. Při této hodnotě E_{acc} byl sledován vliv doby akumulace na výšku píku chloramfenikolu $t_{acc} = 0 \text{ s}, 15 \text{ s}, 30 \text{ s}, 60 \text{ s}, 120 \text{ s}, 200 \text{ s}, 300 \text{ s}$. Roztok byl při akumulaci míchán. Graficky je tato závislost znázorněna na obr. 4.23. Ze závislosti je vidět, že studovaná látka se při koncentraci $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ neakumuluje.



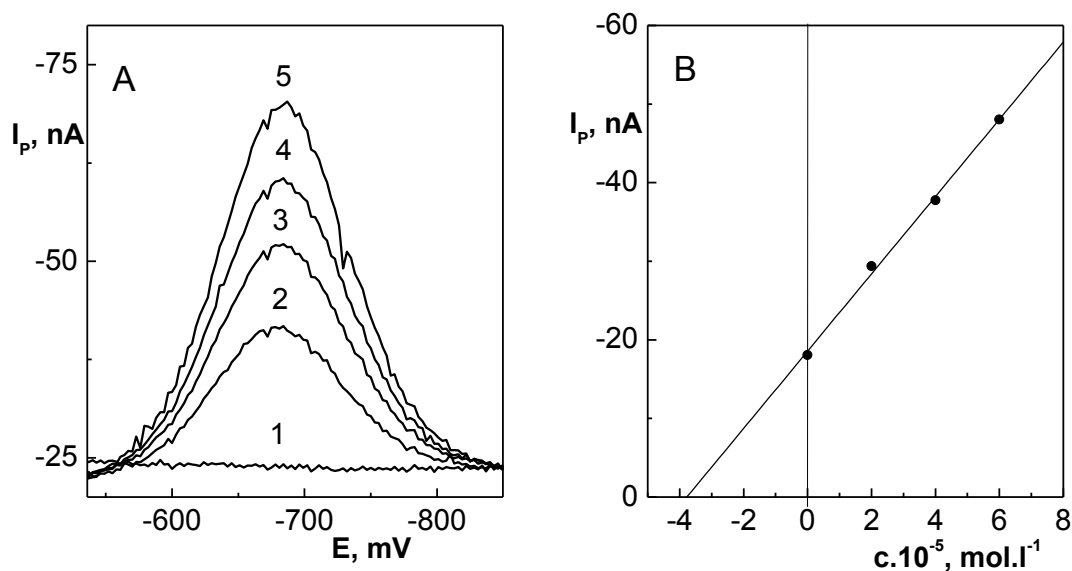
Obrázek 4.22 Závislost proudu píku I_p chloramfenikolu ($c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na potenciálu akumulace E_{acc} , při $t_{acc} = 60 \text{ s}$, měřeno technikou AdSV na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí BR pufru o pH 8.



Obrázek 4.23 Závislost proudu píku I_p chloramfenikolu ($c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na času akumulace t_{acc} , při $E_{acc} = -300 \text{ mV}$, měřeno technikou AdSV na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí BR pufru o pH 8.

4.5 Stanovení chloramfenikolu ve vzorku léčiva Spersadex

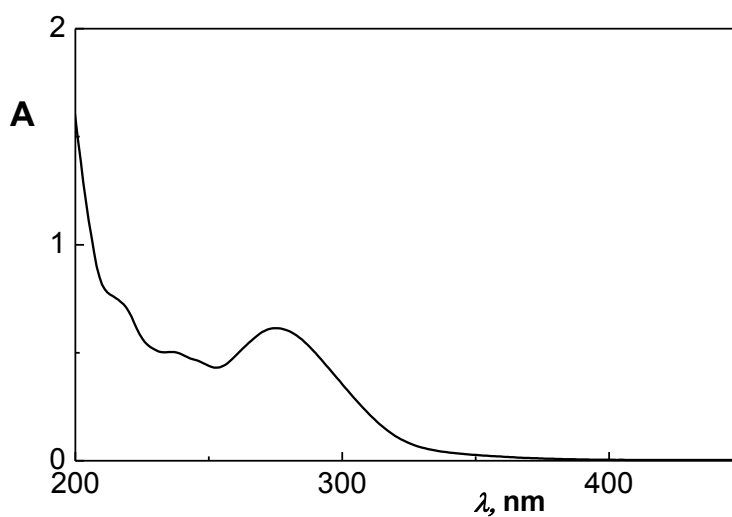
Pro stanovení chloramfenikolu ve vzorku léčiva byla použita metoda standardního přidavku. Vzorek léčiva byl analyzován pomocí DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 8. Koncentrace léčiva chloramfenikolu v kapkách Spersadex byla $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Očekávaná koncentrace ve vzorku léčiva po naředění byla $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, zjištěna byla koncentrace $(3,8 \pm 0,4) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a výtěžek byl $97 \pm 4 \%$. Kontrola stanovení obsahu chloramfenikolu ve vzorku léčiva byla provedena pomocí UV spektrometrie dle českého lékopisu³ při vlnové délce 278 nm s výtěžkem $104 \pm 1 \%$. Postup metody standardního přidavku a příprava vzorku léčiva pro stanovení, včetně kontroly obsahu chloramfenikolu pomocí UV spektrometrie, je popsána v Kap. 2.3. Graficky je metoda standardního přidavku znázorněna DP voltamogramy na obr. 4.24 (A) a příslušná koncentrační závislost na obr. 4.24 (B), parametry metody jsou uvedeny v tab. 4.7. Absorpční spektrum vzorku léčiva je na obr. 4.24.



Obrázek 4.24 Voltamogramy chloramfenikolu měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 8. (1) základní elektrolyt; (2) vzorek v základním elektrolytu; (3) vzorek s přidavkem CAP na koncentraci $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; (4) vzorek s přidavkem CAP na koncentraci $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; (5) vzorek s přidavkem CAP na koncentraci $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (A). Grafické znázornění stanovení koncentrace chloramfenikolu ve vzorku léčiva metodou standardního přidavku (B).

Tabulka 4.7 Parametry metody standardního přidavku chloramfenikolu v koncentračním rozmezí $(2 - 6) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, měřeno metodou DPV na *m*-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 8.

úsek [nA]	směrnice [nA · mol ⁻¹ · l]	korelační koeficient	koncentrace [mol · l ⁻¹]		výtěžek %
			očekavaná	stanovená	
-19,3	$-5,08 \cdot 10^5$	-0,9995	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$3,8 \cdot 10^{-5}$	97±4



Obrázek 4.26 Absorpční spektrum roztoku chloramfenikolu ($c = 6,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) ve vodě. Měřeno v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 10 mm, jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda.

5 Závěr

Pomocí elektrochemických technik byl studován chlorambucil a chloramfenikol na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě. Pro stanovení léčiva chloramfenikolu byly vypracovány metody DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) a byly aplikovány techniky cyklická voltametrie (CV) a adsorpční rozpouštěcí voltametrie (AdSV).

Bylo zjištěno, že chlorambucil poskytuje při CV na HMDE v prostředí metanolu a acetátového pufru o pH 5,4 (1:1) jeden pík při potenciálu -1492 mV, ale dle literatury⁴¹ má být potenciál píku $-1,3$ V (vs Ag/AgCl). Mechanismus redukce chlorambucilu na HDME v práci⁴¹ nebyl objasněn, proto jsme nemohli popsat redukční mechanismus reakce odpovídající našemu signálu. Při stanovení chlorambucilu na m-AgSAE látka poskytovala signál v okraji potenciálového okna. Nebyly nalezeny vhodné podmínky pro stanovení chlorambucilu na m-AgSAE. Bylo zjištěno, že látka nebo produkty elektrochemické reakce interagují s povrchem elektrody a stálost signálu na m-AgSAE se jevila jako nevhodná pro vývoj voltametrické metody stanovení na této elektrodě.

Při studiu chloramfenikolu bylo zjištěno, že látka poskytuje v prostředí BR pufru jednu nebo dvě vlny při DCV a jeden nebo dva píky při DPV. Jako optimální prostředí pro stanovení chloramfenikolu pomocí DCV byl zvolen BR pufr o pH 7 a při DPV o pH 8. Za těchto zvolených podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, kde při DCV poskytovala látka lineární závislost signálu pouze v rozsahu $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a při DPV v celém měřeném rozsahu. Mez stanovitelnosti byla $2,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ při DCV a $2,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ při DPV. Při stanovení v nízkých koncentracích byl signál u DPV lépe vyhodnotitelný a metoda byla citlivější.

Pro ověření použitelnosti vyvinuté metody v reálných matricích byla použita metoda DPV. Byly proměřeny kalibrační závislosti v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, které byly lineární v celém rozsahu. Mez stanovitelnosti byla $4,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v pitné vodě a $2,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v říční vodě. V tab. 5.1 jsou pro srovnání uvedeny limity stanovitelnosti vyvinutých metod pro stanovení chloramfenikolu na m-AgSAE. V tab. 5.2 je uveden přehled dříve publikovaných elektrochemických stanovení chloramfenikolu. Naše vyvinutá metoda pro stanovení chloramfenikolu na m-AgSAE je robustnější a primárně posazena na stanovení

v léčivech, kde je koncentrace vysoká.

Elektrochemické chování chloramfenikolu bylo studováno pomocí cyklické voltametrie v prostředí BR pufru o pH 2, 6, 8 a 10. Na základě dostupné literatury byl navržen a popsán mechanismus elektrochemických reakcí chloramfenikolu na povrchu m-AgSAE pro jednotlivá pH.

Pro aplikaci techniky adsorpční rozpouštěcí voltametrie byl sledován vliv potenciálu akumulace a doby akumulace na výšku píku pro chloramfenikol o koncentraci $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v prostředí BR pufru o pH 8 na m-AgSAE. Bylo zjištěno, že studovaná látka se na povrchu elektrody m-AgSAE neakumuluje.

Pomocí vyvinuté metody DVP byl stanoven chloramfenikol ve vzorku léčiva Spersadex. Stanovení bylo provedeno metodou standardního přídatku v prostředí BR pufru o pH 8, s výtěžkem stanovení $97 \pm 4\%$. Pro porovnání byl také chloramfenikol stanoven spektrofotometricky podle českého lékopisu³ s výtěžkem $104 \pm 1\%$. Oba výtěžky byly v dobré shodě, čímž se ověřila použitelnost metody pro stanovení tohoto typu vzorku.

Tabulka 5.1 Srovnání limitů stanovitelnosti vyvinutých metod pro stanovení chloramfenikolu na m-AgSAE

koncentrace [mol·l ⁻¹]	elektroda/metoda	prostředí	LOQ [mol·l ⁻¹]
1·10 ⁻⁶ – 1·10 ⁻⁴	m-AgSAE/DCV	BR pufr pH 7	2,3·10 ⁻⁶
	m-AgSAE/DPV	BR pufr pH 8	2,1·10 ⁻⁶
	m-AgSAE/DPV	BR pufr pH 8, pitná voda	4,2·10 ⁻⁶
	m-AgSAE/DPV	BR pufr pH 8, říční voda	2,9·10 ⁻⁶

Tabulka 5.2 *Přehled elektrochemických stanovení chloramfenikolu*

elektroda	metoda	prostředí	lineární dynamický rozsah	LOQ [mol·l⁻¹]	cit.
BDDFE	DPV	BR pufr pH 6	$1 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-6}$	60
BDDFE	DCV	BR pufr pH 6	$1 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-6}$	60
EPGCE	CV a SVW	acetátový pufr pH 5,3	$7 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-9}$	1
SMDE	SWV	acetátový pufr pH 4	$2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-7}$	$3,7 \cdot 10^{-7}$	26

6 Literatura

1. Alemu, H., Hlalele, L. Voltammetric determination of chloramphenicol at electrochemically pretreated glassy carbon electrode. *Chemical Society of Ethiopia* **21**, 1–12 (2007).
2. Hampl, F., Moravcová, J., Čopíková, J., Opletal, L., Lapčík, O., Drašar, P. Krása a rozmanitost struktur přírodních antibiotik. *Chemické Listy* **27**, 15–27 (2009).
3. *Český lékopis, 2.díl.* (Grada Publishing, Praha 2009).
4. Chen, H., Rao, H., He, P., Qiao, Y., Nang, F., Liu, H., Cai, M. Potential toxicity of amphenicol antibiotic: binding of chloramphenicol to human serum albumin. *Environmental Science Pollution Research International* **21**, 11340–8 (2014).
5. Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M., Wenke, M., Mühlbchová, E. *Farmakologie a toxikologie*. 519 (Grada Publishing, Praha 2004).
6. Alemayehu, T., Sergawie, A. Electrochemical behavior of chloramphenicol and its determination using cyclic voltametry. *International Journal of Innovation Scientific Research* **8**, 159–171 (2014).
7. Lv, F.-F., Li, N., Zheng, L.-Q., Tung, C.-H. Studies on the stability of the chloramphenicol in the microemulsion free of alcohols. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **62**, 288–94 (2006).
8. Ambrose, P. J. Clinical pharmacokinetics of chloramphenicol and chloramphenicol succinate. *Clinical Pharmacokinetics* **9**, 222–38 (1984).
9. Martínková, J. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 310–311 (Grada Publishing, Praha 2009).
10. Xiao, F., Zhao, F., Li, J., Yan, R., Yu, J., Zeng, B. Sensitive voltammetric determination of chloramphenicol by using single-wall carbon nanotube-gold nanoparticle-ionic liquid composite film modified glassy carbon electrodes. *Analytica Chimica Acta* **596**, 79–85 (2007).
11. Wang, L., Yang, H., Zhang, C., Mo, Y., Lu, X. Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **619**, 54–8 (2008).

12. Santos, L., Barbosa, J., Castilho, M.C., Ramas, F., Riberio, C.A.F., De Silveira, N.M.I. Determination of chloramphenicol residues in rainbow trouts by gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **529**, 249–256 (2005).
13. Ferguson, J., Baxter, A., Young, P., Glenn, K., Elliot, Ch., Weigel, S., Gatermann, R., Ashwin, H., Stead, S., Sharman, M. Detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide residues in poultry muscle, honey, prawn and milk using a surface plasmon resonance biosensor and Qflex® kit chloramphenicol. *Analytica Chimica Acta* **529**, 109–113 (2005).
14. Li, X. Q., Yang, Z., Zhang, Q. H., Li, H. M. Evaluation of matrix effect in isotope dilution mass spectrometry based on quantitative analysis of chloramphenicol residues in milk powder. *Analytica Chimica Acta* **807**, 75–83 (2014).
15. Sichilongo, K. F., Kolanyane, P., Masesane, I. B. A sensitive LC-MS/MS method employing a THF–water solvent system for the determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in bovine muscle. *Analytical Methods* **6**, 7015 (2014).
16. Shen, J., Xia, X., Jang, H., Li, C., Li, J., Li, X., Ding, S. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in poultry and porcine muscle and liver by gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **877**, 1523–9 (2009).
17. Collado, M. S., Mantovani, E. V., Héctor, C. G., Olivieri, C. A. Simultaneous spectrophotometric-multivariate calibration determination of several components of ophthalmic solutions: phenylephrine, chloramphenicol, antipyrine, methylparaben and thimerosal. *Talanta* **52**, 909–920 (2000).
18. Jin, W., Ye, X., Yu, D., Dong, Q. Measurement of chloramphenicol by capillary zone electrophoresis following end-column amperometric detection at a carbon fiber micro-disk array electrode. *Journal of Chromatography B* **741**, 155–162 (2000).
19. Wang, A., Zhang, L., Fang, Y. Determination and separation of chloramphenicol and its hydrolysate in eye-drops by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *Analytica Chimica Acta* **394**, 309–316 (1999).

20. Kazuhiro, F., Hironobu, I., Munetomo, N., Masatoshi, W. Determination of chloramphenicol residues in bee pollen by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International* **91**, 1103–1109 (2008).
21. Pastor, F. T., Dejmková, H., Zima, J., Berek, J. Determination of chloramphenicol by differential pulse voltammetry at carbon paste electrodes – The use of sodium sulfite for removal of oxygen from electrode surface. *Collection Czechoslovak Chemical Communication* **76**, 383–397 (2011).
22. Tajik, H., Malekinejad, H., Rouhani-Razavi, S.-M., Pajouchi, M.R., Mahmoudi, R., Haghazari, A. Chloramphenicol residues in chicken liver, kidney and muscle: a comparison among the antibacterial residues monitoring methods of Four Plate Test, ELISA and HPLC. *Food Chemical Toxicology* **48**, 2464–8 (2010).
23. Agüí, L., Guzmán, A., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J. M. Voltammetric determination of chloramphenicol in milk at electrochemically activated carbon fibre microelectrodes. *Analytica Chimica Acta* **461**, 65–73 (2002).
24. Min, Z., Jingbo, H., Yongchun, L., Qilong, L., Zhongda, W. Study of the Voltammetric Behavior of Chloramphenicol and Its Determination At a Ni/C Modified Electrode. *Analytical Letters* **31**, 237–249 (1998).
25. Huanuwatanakul, S. C., Hailapakul, O. C., Otomizu, S. M. Electrochemical analysis of chloramphenicol using boron-doped diamond electrode applied to a flow-injection system. *Analytical science* **24**, 493–498 (2008).
26. Yarnitzky, C., Franklin, W. Square wave polarographic and voltammetric analysis of selected electroreducible drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **75**, 161–169 (1991).
27. Basilio, M. Spectrophotometric assay for chloramphenicol and some derivatives in the pure form and in formulations. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis* **5**, 577–583 (1987).
28. Reinikainen, P., Vilpo, L. M., Seppg, E., Vilpo, J. A. Kinetics of chlorambucil in vitro : effects of fluid matrix , human gastric juice , plasma proteins and red cells. *Chemico-Biological Interaction* **103**, 187–198 (2000).

29. Silvennoinen, R., Malminiemi, K., Malminiemi, O., Seppa, E. Pharmacokinetics of Chlorambucil in Patients with Chronic Lymphocytic Leukaemia : Comparison of Different Days , Cycles and Doses. *Pharmacology and Toxicology* **87**, 223–228 (2000).
30. Sharma, P., Ganta, S., Denny, W., Garg, S. Formulation and pharmacokinetics of lipid nanoparticles of a chemically sensitive nitrogen mustard derivative: Chlorambucil. *International Journal of Pharmaceutics* **367**, 187–94 (2009).
31. Panovská, A., Doubek, M. Chronická lymfocytární leukemie - diagnostika a léčba. *Onkologie* **7**, 117–120 (2013).
32. Klener, P., Klener, jr. P. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. (Grada Publishing, Praha 2009).
33. Gupta, A., Saha, P., Descôteaux, C., Leblanc, V., Asselin, É., Bérubé, G. Design, synthesis and biological evaluation of estradiol-chlorambucil hybrids as anticancer agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **20**, 1614–8 (2010).
34. Malecki, F., Crawhall, J. C. Determination of Melphalan and Chlorambucil in Tablet Dosage form Using High-Performance Liquid Chromatography and Amperometric Detection. *Analytical Letters* **23**, 1685–1693 (1990).
35. Davies, I. D., Allanson, J. P. & Causon, R. C. Rapid determination of the anti-cancer drug chlorambucil (LeukeranTM) and its phenyl acetic acid mustard metabolite in human serum and plasma by automated solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. **732**, 173–184 (1999).
36. Setiyanto, H., Saraswaty, V., Hertadi, R., Noviandri, I., Buchari, B. Cyclic Voltammetric Study of Chlorambucil in the presence of 4-Chloro Butyronitrile in Aqueous Solution. *International Journal of ChemTech Research* **3**, 1986–1992 (2011).
37. Setiyanto, H., Saraswaty, V., Hertadi, R., Noviandri, I., Buchari, B. Chemical Reactivity of Chlorambucil in Organic Solvents: Influence of 4-Chloro Butyronitrile Nucleophile to Voltammogram Profiles. *International Journal of Electrochemical Science* **6**, 2090–2100 (2011).

38. Negreira, N., Mastroianni, N., López de Alda, M., Barceló, D. Multianalyte determination of 24 cytostatics and metabolites by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry and study of their stability and optimum storage conditions in aqueous solution. *Talanta* **116**, 290–9 (2013).
39. Gómez-Canela, C., Ventura, F., Caixach, J., Lacorte, S. Occurrence of cytostatic compounds in hospital effluents and wastewaters, determined by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **406**, 3801–14 (2014).
40. Götze, H.-J., Kiffmeyer, T., Jursch, M., Lüders, U. Trace enrichment , chromatographic separation and biodegradation of cytostatic compounds in surface water. *Journal of Analytical Chemistry* **361**, 185–191 (1998).
41. Wang, J., Lin, M. S., Villa, V. Investigation of the Adsorptive Stripping Voltammetric Behaviour of the Anticancer Drugs Chlorambucil and 5-Fluorouracil. *Analyst* **112**, 247–251 (1987).
42. Barek, J., Yosypchuk, B. Vlastnosti pevných a pastových amalgámových pracovních elektrod odlišné od elektrod z kovové rtuti. *Chemické Listy* **103**, 284–290 (2009).
43. Vyskočil, V., Daňhel, A., Fischer, J., Novotný, V., Deýlová, D., Karanová-Musilová, J., Maixnerová, L., Pecková, K., Barek, J. Krása a užitečnost nových elektrodových materiálů. *Chemické Listy* **104**, 1181–1195 (2010).
44. Barek, J., Yosypchuk, B. Pevné amalgámové elektrody a jejich využití v analýze biologicky aktivních látek. *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii*, 15–30 (2006).
45. Novotný, L., Yosypchuk, B. Pevné stříbrné amalgámové elektrody. *Chemické Listy* **1120**, 1118–1120 (2000).
46. Yosypchuk, B., Novotný, L. Electrodes of Nontoxic Solid Amalgams for Electrochemical Measurements. *Electroanalysis* **14**, 1733–1738 (2002).
47. Tuček, M., Bencko, V., Krýsl, S. Zdravotní rizika rtuti ze zubních amalgámů. *Chemické Listy* **101**, 1038–1044 (2007).
48. Yosypchuk, B., Novotný, L. Nontoxic Electrodes of Solid Amalgams. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **32**, 141–151 (2002).

49. Yosypchuk, B., Barek, J. Analytical Applications of Solid and Paste Amalgam Electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **39**, 189–203 (2009).
50. Barek, J., Fischer, J., Navrátil, T., Pecková, K., Yosypchuk, B., Zima, J. Nontraditional Electrode Materials in Environmental Analysis of Biologically Active Organic Compounds. *Electroanalysis* **19**, 2003–2014 (2007).
51. Ječmínková, J. *Voltametrické stanovení chloramfenikolu a ofloxacinu na borem dopované diamantové filmové elektrodě*. (Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha 2011).
52. Miller, J. N., Miller, J. C. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. (Person Education, 2005).
53. Laviron, E., Roullier, L. The reduction mechanism of aromatic nitro compounds in aqueous medium Part I . Reduction to dihydroxylamines between pH 0 and 5. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **288**, 165–175 (1990).
54. Laviron, E., Vallat, A. The reduction mechanism of aromatic nitro compounds in aqueous medium Part V. The reduction of nitrosobenzene between pH 0.4 and 13. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **379**, 427–435 (1994).
55. Fgazek, Z., Dunzanovic, D., Sunjevii, D. Polarographic and Electrochemical Studies of Some Aromatic and Heterocyclic Nitro Compounds, Part I: General Mechanistic Aspects. *Electroanalysis* **4**, 783–794 (1992).
56. Zuman, P. Electroreduction of aromatic compounds: case for comparison of information obtained by polarography and voltammetry. *Collection of Czechoslovak Chemical Communication* **58**, 41–46 (1993).
57. Zuman, P. Polarografie při studiu chemických reakcí. *Chemické Listy* **99**, 91–99 (1997).
58. Charvátová, M. *Voltametrické stanovení 2-methoxy-5-nitrofenolu na netradičních elektrodách*. (Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha 2010).
59. Pecková, K. *A contribution to the determination of nitro, amino, and hydroxy derivatives of naphthalene using electrochemical methods*. (Disertační práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha 2006).

60. Ječmínková, J. *Voltametrické stanovení chloramfenikolu na borem dopované diamantové filmové elektrodě*. (Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 2009).