

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra analytické chemie**

---



**Voltametrické stanovení Carmustinu  
na stříbrné tuhé amalgamové elektrodě**

Tato práce byla finančně podporována MŠMT ČR  
(projekt MSM 0021620857 a LC 06035)

Bakalářská práce

Praha 2007

Vrzalová Lucie

Přírodovědecká fakulta UK  
KNIHOVNA CHEMIE



3233141191

## **Prohlášení**

Tato bakalářská práce byla vypracována na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2006 – 2007, pod vedením školitele Mgr. Karoliny Peckové, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem veškerou použitou literaturu řádně citovala.

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

V Praze dne 8. června 2007

*Karolina Pecko*

podpis

**Předmětová hesla:** analýza léčiv  
elektrochemie

**Klíčová slova:** Carmustine  
DC voltametrie  
diferenční pulsní voltametrie  
cyklická voltametrie  
meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgamová elektroda  
visící rtuťová kapková elektroda

Úvodem bych chtěla poděkovat svému školiteli Mgr. Karolině Peckové, Ph.D. a současně i Mgr. Janu Fischerovi za odborné vedení a dále všem členům Katedry analytické chemie za všeobecnou pomoc a cenné připomínky k mé práci.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům, celé rodině i přátelům za podporu během celého studia.

# **Obsah**

<b>1. Úvod .....</b>	<b>9</b>
1.1 Cíl práce .....	9
1.2 Vlastnosti studované látky .....	10
1.2.1 Farmakologické vlastnosti .....	10
1.2.1.1 Farmakodynamické vlastnosti .....	10
1.2.1.2 Farmakokinetické vlastnosti .....	11
1.2.2. Klinické údaje .....	11
1.2.2.1 Terapeutická indikace .....	11
1.2.2.2 Dávkování a způsob podání .....	12
1.2.2.3 Nežádoucí účinky .....	12
1.2.3 Příprava Carmustinu .....	13
1.2.4 Stanovení Carmustinu.....	14
1.2.4.1 Stanovení Carmustinu dle lékopisu .....	15
1.3 Použité pracovní elektrody .....	16
1.3.1 Stříbrná tuhá amalgamová elektroda .....	16
1.3.2 Visící rtuťová kapková elektroda .....	18
1.4. Použité metody .....	19
1.4.1 Diferenční pulsní voltametrie .....	19
1.4.2 DC voltametrie.....	19
1.4.3 Cyklická voltametrie.....	19
<b>2. Experimentální část .....</b>	<b>20</b>
2.1 Reagencie.....	20
2.2 Studovaná látka.....	21
2.3 Aparatura .....	22
2.4 Použité pracovní elektrody .....	23
2.4.1 Meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgamová elektroda.....	23
2.4.2 Visící rtuťová kapková elektroda .....	24
2.5 Pracovní postupy .....	25
2.6 Stálost zásobního roztoku Carmustinu .....	26

<b>3. Výsledky a diskuze.....</b>	<b>28</b>
3.1 Voltametrické stanovení Carmustinu na meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgamové elektrodě .....	29
3.1.1 DC voltametrie Carmustinu.....	29
3.1.1.1 Vliv pH .....	29
3.1.1.2 Koncentrační závislost.....	32
3.1.1.3 Cyklická voltametrie.....	34
3.1.1.4 Ověření difúzního charakteru limitního proudu .....	35
3.1.2 Diferenční pulsní voltametrie Carmustinu.....	36
3.1.2.1 Vliv pH .....	36
3.1.2.2 Koncentrační závislost.....	39
3.2 Voltametrické stanovení Carmustinu na visící rtuťové kapkové elektrodě.....	41
3.2.1 DC voltametrie Carmustinu.....	41
3.2.1.1 Vliv pH .....	41
3.2.1.2 Koncentrační závislost.....	45
3.2.2 Diferenční pulsní voltametrie Carmustinu.....	47
3.2.2.1 Vliv pH .....	47
3.2.2.2 Koncentrační závislost.....	51
<b>4. Závěr a diskuse.....</b>	<b>53</b>

# Seznam použitých zkrátek a symbolů

$A$	absorbance
BCNU	Carmustine
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
$c$	molární koncentrace [mol dm <sup>-3</sup> ]
C.A.S.	Chemical Abstract Service
CV	cyklická voltametrie
DCV	DC voltametrie
DPV	diferenční pulsní voltametrie
$E_{in}$	kladnější regenerační potenciál [mV]
$E_{fin}$	zápornější regenerační potenciál [mV]
$E_p$	potenciál píku [mV]
$E_v$	potenciál vlny [mV]
GC	plynová chromatografie
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
IARC	The International Agency for Research on Cancer
$I_{lim}$	limitní proud [nA]
$I_p$	proud píku [nA]
i.v.	intravenózně
LD <sub>50</sub>	smrtelná dávka pro daného jedince v 50 % případů
LDLO	nejnižší smrtelná dávka
$L_Q$	mez stanovitelnosti [mol dm <sup>-3</sup> ]
$L_{1/2}$	interval spolehlivosti
m-AgSAE	meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgamová elektroda
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
NPP	normální pulsní polarografie
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
$s$	směrodatná odchylka mediánu [nA]
$s_r$	relativní směrodatná odchylka mediánu [%]
$t$	čas [s]
$v_{sc}$	rychlosc scanu [mV s <sup>-1</sup> ]

$\varepsilon$	molární absorpční koeficient [ $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$ ]
$\lambda$	vlnová délka [nm]
$\lambda_{max}$	vlnová délka absorpčního maxima [nm]

# **1. Úvod**

## **1.1 Cíl práce**

Tato práce se zabývá studiem elektrochemického chování protinádorového léčiva Carmustinu s využitím diferenční pulsní voltametrii a DC voltametrii.

Cílem práce je nalezení optimálních podmínek pro stanovení Carmustinu na meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgamové elektrodě (m-AgSAE) s cílem dosáhnout co nejnižší meze stanovitelnosti.

Naměřené výsledky byly porovnány s výsledky, které byly proměřeny na visící rtuťové kapkové elektrodě z důvodu možného výskytu druhého píku a vyšší citlivosti visící rtuťové kapkové elektrody.

Vyvinuté voltametrické metody by mohly být použity například ke stanovení obsahu Carmustinu v lékových formách.

## 1.2 Vlastnosti studované látky

### 1.2.1 Farmakologické vlastnosti

#### 1.2.1.1 Farmakodynamické vlastnosti

Carmustine (BCNU) je cytostatikum ze skupiny nitrosomočovin. Strukturní vzorec viz Obr. 2.1 kapitola 2.2. Cytostatika jsou látky zpomalující či zastavující růst buněk nebo dokonce způsobující jejich destrukci.<sup>1</sup> Má převážně alkylující mechanismus cytostatického účinku, alkyluje DNA a RNA. Od klasických alkylačních látek se liší tím, že metabolickou degradací vzniká kromě alkylující skupiny ještě isokyanátová struktura ( $R-N=C=O$ ), která reaguje s aminoskupinami aminokyselin a inhibuje „opravu“ poškozené DNA. Karbaminací aminokyselin v molekulách bílkovin inhibuje i některé důležité enzymy. Snižuje koncentraci  $NAD^+$  v nádorových buňkách a zasahuje do některých metabolických pochodů (inhibuje formiminotransferázu).<sup>2</sup>

Toxické účinky látky jsou shrnutý v Tab.1.1 a právní předpisy uvedeny v Tab. 1.2.

**Tab. 1.1**  
*Toxikologické vlastnosti látky.*<sup>3</sup>

---

#### Akutní toxicita

---

$LD_{50}$  (orálně, krysa) =  $30 - 34 \text{ mg kg}^{-1}$   
 $LD_{50}$  (intraperitoneálně, myš) =  $26 \text{ mg kg}^{-1}$   
 $LD_{50}$  (subkutánně, myš) =  $24 \text{ mg kg}^{-1}$   
 $LD_{50}$  (orálně, myš) =  $19 - 25 \text{ mg kg}^{-1}$   
 $LDLO$  (intravenózně, dítě) =  $78 \text{ mg kg}^{-1}$   
 $LDLO$  (parenterálně, žena) =  $1\ 566 \text{ mg kg}^{-1}$

---

#### Chronická toxicita

---

*Karcinogenita:*

Carmustine je považován za pravděpodobný karcinogen  
Dle seznamu karcinogenů IARC patří do skupiny 2A (cit.<sup>4</sup>)

*Mutagenita:*

Carmustine je považován za mutagen

*Teratogenita:*

Může vyvolat vrozené malformace plodu

*Riziko pro reprodukci:*

Může vyvolat poškození dědičných vlastností, poškodit reprodukční schopnost

---

**Tab. 1.2**

Právní předpisy vztahující se k látce.<sup>3</sup>

---

**Klasifikace a označení podle směrnice EU**

---

*Označení nebezpečí:*

T+ vysoce toxický

*Rizikové věty (R-věty): 45-46-60-61-28*

Může vyvolat rakovinu, poškození dědičných vlastností, poškodit reprodukční schopnost, poškodit plod v těle matky, je vysoce toxický při požití.

*Bezpečnostní věty (S-věty): 53-22-36/37/39-45*

Zamezit expozici – před použitím si obstarat speciální instrukce, nevdechovat prach, používat vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné brýle nebo obličejoby štít. V případě nehody je nutno okamžitě vyhledat lékařskou pomoc.

---

### 1.2.1.2 Farmakokinetické vlastnosti<sup>5</sup>

Carmustine je vysoce lipofilní, snadno proniká membránami, proniká i hematoencefalickou bariérou. Hladiny látky, eventuálně jejich metabolitů v mozkomíšním moku dosahují asi 50 % hladin v krvi. Carmustine se v organismu velice rychle metabolizuje, do 15 minut po i.v. injekci již nelze prokázat přítomnost nemetabolizované látky. Do 90 hodin po i.v. injekci se asi 60 až 70 % podané látky vyloučí močí ve formě metabolitů, 10 % plícemi jako CO<sub>2</sub>, osud zbývajícího podílu není znám.

### 1.2.2 Klinické údaje<sup>5</sup>

#### 1.2.2.1 Terapeutická indikace

BCNU se podává samotný, anebo jako složka uznaných kombinací s jinými cytostatiky v indikacích :

- Při mozkových nádorech
- Při mnohočetném myelomu
- Při Hodgkinově chorobě
- Při non-hodgkinských lymfomech

### 1.2.2.2 Dávkování a způsob podání

Při monoterapii je doporučená dávka BCNU u dosud neléčených pacientů  $150 - 200 \text{ mg m}^{-2}$  i.v. každých 6 týdnů. Tuto dávku je možno podat v jediné injekci anebo ji rozdělit do dvou dílčích dávek po  $75 - 100 \text{ mg m}^{-2}$ , podaných ve dvou po sobě následujících dnech. Připravený roztok se smí podávat jenom i.v. a musí se aplikovat kapací infúzí.

### 1.2.2.3 Nežádoucí účinky

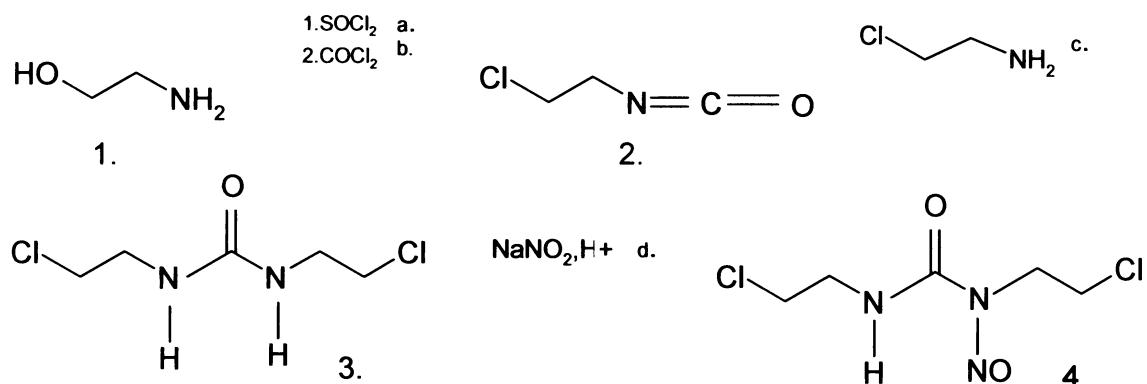
- **Hematotoxické** – opožděný útlum kostní dřeně je nejčastější a nejvážnější projev toxicity BCNU. Obvykle se projeví za 4 až 6 týdnů po podání BCNU a je závislý na dávce.
  - trombocytopenie (zmenšení počtu krevních destiček pod normu) se objevuje do 4 týdnů a přetrvává 1 až 2 týdny.
  - leukopenie (zmenšení počtu bílých krvinek pod normu) vzniká mezi 5. a 6. týdnem po podání BCNU a setrvává také 1 až 2 týdny.
  - po dlouhodobé terapii nitrosomočovinami byl popsán i vznik akutní leukémie a dysplazie (porucha vývoje nebo růstu) kostní dřeně.
- **Pneumotoxické** – byl popsán vznik plicních infiltrátů, a to mezi 9. dnem až 43. týdnem po léčení BCNU nebo přípravky příbuzných nitrosomočovin.
  - další rizikové faktory jsou plicní onemocnění v anamnéze a dlouhodobá terapie.
- **Poruchy gastrointestinálního traktu** – po i.v. podání BCNU jsou nauzea a zvracení časté. Vznikají obvykle do 2 hodin po injekci, trvají 4 až 6 hodin a jsou závislé na dávce.
- **Hematotoxické** – u nízkého procenta pacientů se mohou jako projevy reverzibilní hepatotoxicity zvýšit hladiny transamináz, alkalické fosfatázy a bilirubinu.
- **Neurotoxické** – po vysokých kumulativních dávkách a dlouhodobém podávání BCNU a jiných nitrosomočovin může vzniknout progresivní azotémie (zmnožení dusíkatých látek v krvi), zmenšení ledvin, i selhání ledvin.
- **Kardiovaskulární** – hypotenze.
  - tachykardie (zrychlená činnost srdeční).

- **Jiné projevy toxicity** – náhodné potřísnění kůže roztokem BCNU může vyvolat lokální pálení a hyperpigmentaci.
  - rychlá i.v. infúze BCNU může vyvolat intenzivní flush kůže a otok víček do 2 hodin, setrvávající asi 4 hodiny.

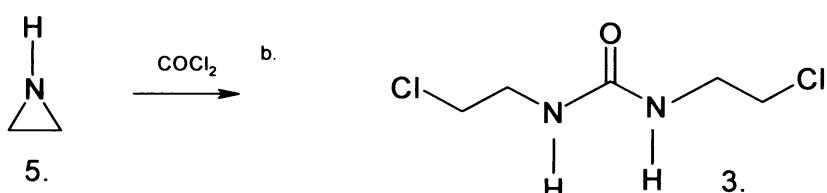
### 1.2.3 Příprava Carmustinu

BCNU se připravuje nitrosací N,N'-bis(2-chlorethyl)močoviny. Močovinu lze získat adicí 2-chlorethylaminu na 2-chlorethylisokyanát (Obr.1.1.A). Alternativní syntézu močoviny představuje reakce aziridinu s fosgenem (Obr. 1.1.B).<sup>1</sup>

Schéma syntézy je znázorněno na Obr. 1.1.



**Obr. 1.1.A**



**Obr.1.1.B**

*reaktany a produkty*

1. 2-hydroxyethylamin
2. 2-chlorethylisokyanát
3. N, N'-bis(2-chlorethyl)močovina
4. Carmustine
5. aziridin

*činidla*

- a. chlorid sulfonylu
- b. chlorid karbonylu
- c. 2-chlorethylamin
- d. dusitan sodný v  $\text{H}^+$  prostředi

**Obr. 1.1**

*Syntéza Carmustinu.*

## 1.2.4 Stanovení Carmustinu

Ke stanovení Carmustinu je možné použít polarografické a voltametrické metody<sup>6,7</sup>, neboť zkoumaná látka obsahuje N-nitroso-skupinu, která je v potenciálovém oknu rtuťové elektrody elektrochemicky aktivní a předpokládá se její snadná redukce na hydroxylamin a v kyselém prostředí na amino skupinu. Parametry a výsledky měření zmíněných metod jsou uvedeny v Tab. 1.3.

Ke stanovení lze využít i chromatografické metody, např. GC.<sup>8</sup>

**Tab. 1.3.**

*Metody stanovení BCNU*

---

### DPP<sup>6</sup>

*Parametry měření:* Při stanovení byla použita rtuťová kapková elektroda s kontrolovanou dobou kapky, platinová pomocná a referentní kalomelová elektroda.

*Výsledky měření:* Při pH roztoku 2,5 obsahující 0,1 mol dm<sup>-3</sup> KCl okyselený HCl se objevuje jednoduchá vlna A, jejíž půlsvinný potenciál, šířka a výška závisí na pH, a která odpovídá redukci BCNU v jednoelektronové reakci. Při vyšších hodnotách pH byla vlna A stále přítomna, ale objevila se při negativnějších potenciálech druhá vlna B, jejíž výška a šířka také závisela na pH, ale pozice vlny byla téměř konstantní. Vlna B odpovídala redukci BCNU v jednoelektronové reakci, která nevyžaduje přítomnost H<sup>+</sup> iontů.

### DPP a CV<sup>7</sup>

*Parametry měření:* Při stanovení byla použita rtuťová kapková elektroda s kontrolovanou dobou kapky, platinová pomocná a referentní kalomelová elektroda. Jako základní elektrolyt byl pro DC polarografií použit 0,25 mol dm<sup>-3</sup> acetátový pufr o pH 4,7 s 5% přídavkem ethanolu a 0,1 mol dm<sup>-3</sup> acetátový pufr o pH 4,7 s 1% přídavkem ethanolu pro CV, NP a DP polarografií.

*Výsledky měření:* Při DC a DP polarografií byly nejvyšší páky získány v roztoku v rozmezí pH 3 – 5, v roztocích o pH vyšším jak 5 byly polarografické vlny nižší, přičemž půlsvinný potenciál se posouval k negativním hodnotám. Při cyklické

---

---

voltametrii se objevila dobře vyvinutá vlna odpovídající katodické redukci, ale vlna odpovídající oxidaci pozorována nebyla. To indikuje ireverzibilní děj redukce BCNU. Mechanismus redukce N-nitrososkupiny je dvou- či čtyřelektronový proces, který závisí na pH základního elektrolytu. Při pH menším jak 6 redukce probíhá ve dvou krocích; první odpovídá dvouelektronové redukci na hydroxylamin a druhý krok dvouelektronové redukci na amin. Při pH roztoku vyšším jak 11 je redukce jednostupňový proces, který odpovídá dvouelektronové redukci.

---

#### 1.2.4.1 Stanovení Carmustinu dle lékopisu<sup>9</sup>

BCNU je zapsán v Českém lékopise, kde jsou popsány metody na stanovení čistoty a obsahu.

Při zkoušce na čistotu se provádí tenkovrstvá chromatografie za použití vrstvy silikagelu. Možnou nečistotou je 1,3-bis(2-chlorethyl)močovina.

Obsah BCNU je stanovován spektrofotometricky při vlnové délce maxima  $\lambda_{max} = 230 \text{ nm}$ .

## 1.3 Použité pracovní elektrody

### 1.3.1 Stříbrná tuhá amalgamová elektroda

Stříbrná tuhá amalgamová elektroda (AgSAE) je vhodnou alternativou k visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE). Existují tři druhy AgSAE lišící se úpravou povrchu: meniskem modifikovaná (m-AgSAE), filmová (MF-AgSAE) a leštěná (p-AgSAE) elektroda, která neobsahuje kapalnou rtut'.

Stříbrná tuhá amalgamová elektroda má následující výhody:<sup>10</sup>

- ✓ Široké potenciálové okno v katodické oblasti
- ✓ Nenáročnou předúpravu
- ✓ Netoxicitu elektrodového materiálu
- ✓ Dlouhodobou stabilitu odezvy
- ✓ Snadnou manipulaci při využití v terénních měřeních
- ✓ Nízké pořizovací náklady

Pro studium voltametrického chování Carmustinu byla používána meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgamová elektroda (m-AgSAE). Citlivost stanovení pomocí m-AgSAE je v porovnání s visící rtuťovou kapkovou elektrodou nižší, avšak dostatečná pro řadu environmentálních aplikací.<sup>11</sup>

Tato elektroda se svým chováním (nedochází-li ke specifické interakci mezi stříbrem z elektrody a složkami roztoku) podobá visící rtuťové kapkové elektrodě; potenciály píků a proudy pozadí jsou na obou elektrodách téměř totožné.

Pro úspěšnou aplikaci m-AgSAE jsou nutné tři základní operace: amalgamace, aktivace a regenerace.

Amalgamace se provádí jednou týdně nebo například při zhoršení citlivosti či reprodukovatelnosti měření, při nepřítomnosti menisku kapalného amalgamu na povrchu elektrody. Do lahvičky se dá  $1 - 2 \text{ cm}^3$  kovové rtuti a  $5 - 10 \text{ cm}^3$  deionizované vody. Dolní část elektrody se ponoří do rtuti a intenzivně se lahvičkou se rtutí přibližně 15 s míchá. Elektroda se následně opláchné deionizovanou vodou a zkонтroluje se přítomnost menisku rtuti na dolní části elektrody.

Aktivace, trvající 5 minut, se provádí vždy na začátku pracovního dne, po přestávkách v měřeních delších než 1 hodina a po amalgamaci. Aktivace se provádí v roztoku  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  KCl, který není probubláván dusíkem, při vloženém napětí  $-2200 \text{ mV}$ . Během aktivace se z menisku m-AgSAE odstraňují oxidy a adsorbované látky, čímž se zlepšuje citlivost a reprodukovatelnost následných měření.

Regenerace, trvající asi 30 s, se provádí v analyzovaném roztoku před každým měřením automaticky, a to vždy po spuštění měřícího programu. Tím se zpravidla dociluje dobré opakovatelnosti výsledků. Pro obnovení povrchu m-AgSAE se na elektrodu vkládá po dobu 20 – 30 s potenciál o  $50 - 100 \text{ mV}$  pozitivnější než potenciál vylučování vodíku nebo rozkladu základního elektrolytu. Při tomto potenciálu dochází k redukci oxidů kovů tvořících pevný amalgam (Hg a Ag) a k odstranění adsorbovaných látek. Současně probíhá akumulace kovů přítomných v analyzovaném roztoku. K zabránění nekontrolovaného procesu akumulace, zahrnuje měřící program skokové změny potenciálu z negativních hodnot na pozitivnější, při nichž dochází k rozpouštění naakumulovaných kovů.<sup>10</sup>

### **1.3.2 Visící rtuťová kapková elektroda**

Rtuť jako elektrodový materiál má dvě z hlediska elektrochemické analýzy velice významné přednosti oproti tuhým materiálům:

- ✓ Její povrch je homogenní, atomicky hladký a lze ho podle potřeby snadno obnovovat, takže každou analýzu je možno provádět vždy s novým, reprodukovatelně obnovovaným povrchem elektrody
- ✓ Vysoká hodnota přepětí vodíku umožňuje pracovat s elektrodou v neutrálních roztocích při velmi negativních potenciálech, kdy lze vyloučit i např. alkalické kovy, aniž je reakce překryta redukcí vodíkového iontu

Pro studium voltametrického chování Carmustinu byla používána visící rtuťová kapková elektroda (HMDE).

U HMDE se analýza provádí na kapce, jejíž povrch není v průběhu měření obnovován. Před další analýzou se kapka odklepne elektronicky řízeným klepátkem, které lehkým úderem na kapiláru odtrhne starou kapku a vytvoří se kapka nová.

Výhodou HMDE je oproti klasické rtuťové kapkové elektrodě:

- ✓ Menší spotřeba rtuti
- ✓ Menší nabíjecí proud, neboť povrch kapky se v průběhu měření nemění

Nevýhodou jsou však:

- ✗ Vyšší problémy s pasivací vzhledem k neobnovovanému povrchu elektrody v průběhu jednoho voltametrického záznamu<sup>12</sup>

## 1.4. Použité metody

### 1.4.1 Diferenční pulsní voltametrie

DPV patří k nejcitlivějším elektroanalytickým metodám, při kterých se na potenciál, který se lineárně mění s časem, vkládá napěťový puls o amplitudě 10 až 100 mV a době trvání řádově desítek milisekund. Registruje se rozdíl proudů změřených těsně před vložením pulsu a na jeho konci. Závislost rozdílu proudu na potenciálu má tvar píku. Poloha píku na potenciálové ose je dána kvalitou analytu a jeho výška závisí na koncentraci depolarizátoru.

Pomocí DPV lze stanovit koncentrace analytů až do  $10^{-8}$  mol dm<sup>-3</sup> u látek redukujících se reverzibilně i u látek, které se redukují irreverzibilně.<sup>12</sup>

### 1.4.2 DC voltametrie

U DC voltametrie se potenciál vkládaný na pracovní elektrodu lineárně mění s časem (rosté či klesá). Tato metoda většinou využívá větších rychlostí změny potenciálu na čase. Voltametrická křivka má tvar vlny až sigmoidálního píku v závislosti na velikosti plochy elektrody, rychlosti scanu a rychlosti elektrodové reakce. Poloha vrcholu píku zpravidla odpovídá půlvlnovému potenciálu a jeho výška také závisí na koncentraci depolarizátoru.<sup>12</sup>

### 1.4.3 Cyklická voltametrie

Při cyklické voltametrii se stejně jako při DC voltametrii potenciál vkládaný na pracovní elektrodu mění lineárně s časem, po záznamu katodického či anodického scanu se ovšem ještě změní směr polarizace. Lze tak sledovat následné elektrochemické chování produktů oxidace či redukce a usuzovat na mechanismus elektrodových dějů. Voltametrické křivky mají tvar píku, proud píku závisí na rychlosti časové změny potenciálu.<sup>12</sup>

## 2. Experimentální část

### 2.1 Reagencie

Zásobní roztok Carmustinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  byl připraven rozpuštěním 0,00535 g látky v 25 cm<sup>3</sup> deionizované vody pomocí ultrazvuku. Roztok byl uchováván ve tmě v chladničce.

Roztoky o nižších molaritách byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku látky deionizovanou vodou.

Další použité chemikálie: kyselina boritá, kyselina octová (99,8%), kyselina fosforečná (85%), hydroxid sodný, chlorid draselný (vše čistoty p.a., Lachema Brno, Česká republika).

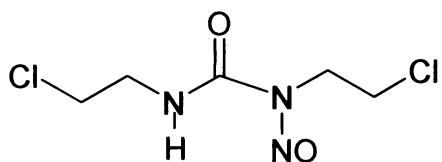
Brittonovy-Robinsonovy tlumivé roztoky<sup>13</sup> o příslušném pH byly připraveny smísením 0,2 mol  $\text{dm}^{-3}$  NaOH s roztokem obsahujícím kyselinu boritou, fosforečnou a octovou, každou o koncentraci 0,04 mol  $\text{dm}^{-3}$ . Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem Jenway 4330 (Jenway, Essex, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005). pH-metr byl kalibrován standardními vodnými pufry za laboratorní teploty.

Pro přípravu všech roztoků byla používána deionizovaná voda (Millipore Milli-Q plus systém, Millipore, USA). Používané roztoky byly uchovávány ve skleněných nádobách.

Kyslík byl ze studovaných roztoků odstraňován pětiminutovým probubláním dusíkem čistoty 4.0 (Linde, Praha).

## 2.2 Studovaná látka

Carmustine je nažloutlý zrnitý prášek. Je relativně těžce rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v etheru a v dichlormethanu, snadno rozpustný v ethanolu. Taje při asi 31°C, za rozkladu.<sup>9</sup> Strukturní vzorec je na Obr. 2.1.



1,3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosomočovina

CAS Registry Number : 154-93-8

Sumární vzorec : C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**Obr. 2.1**

*Strukturní vzorec BCNU.*

Relativní molekulová hmotnost: 214,05

Teplota tání: 30 – 32 °C

Hustota: 1,46 ± 0,1 g cm<sup>-3</sup>

Rozpustnost ve vodě<sup>14</sup>: 4000 mg dm<sup>-3</sup> při 25 °C

## **2.3 Aparatura**

Při všech stanoveních byla použita sestava Eko-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 5.1, firma EkoTrend-Plus ČR, pracujícím v operačním systému Windows XP 2000 (Microsoft Corporation, USA).

Jednotlivá měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení. Jako referentní elektroda byla použita argentochlорidová elektroda ( $3 \text{ mol dm}^{-3}$  KCl). Jako pomocná elektroda byla použita platinová elektroda (Monokrystaly, Turnov). Použité pracovní elektrody jsou charakterizovány níže. Při technice DPV byly na elektrody vkládány pulsy o šířce 80 ms a modulační amplitudě – 50 mV. Při technice DPV a DC voltametrii byla použita rychlosť nárůstu potenciálu  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .

Spektrofotometrické měření bylo prováděno na přístroji Hewlett-Packard 8453 Diode-Array Spectrophotometer (Nizozemsko) v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1 mm.

## 2.4 Pracovní elektrody

### 2.4.1 Meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgamová elektroda

Byla používána meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgamová elektroda č. 2-05-18 vyrobená firmou Polaro-Sensors, Praha. V rámci měření byly prováděny s elektrodou tři operace, kterými byl obnovován povrch elektrody.

Amalgamace: Ponořením elektrody do kapalné rtuti asi na 15 s se obnovil celý meniskus. Amalgamace byla prováděna vždy asi po jednom týdnu, anebo po dlouhodobém přerušení práce.

Elektrochemická aktivace: Aktivace byla prováděna v roztoku  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  KCl, který nebyl probubláván dusíkem, vložením napětí  $-2200 \text{ mV}$  po dobu 300 s. Aktivace byla prováděna po amalgamaci a při přerušení práce na dobu delší než jednu hodinu.

Regenerace: Skokové střídání kladnějšího konstantního potenciálu  $E_{in}$  a zápornějšího konstantního potenciálu  $E_{fin}$  v intervalech 0,1 s po dobu 15 s. Potenciálový program končil vždy při zápornějším potenciálu.

Hodnoty potenciálů  $E_{in}$  a  $E_{fin}$  jsou pro jednotlivá pH uvedeny v Tab. 2.1.

**Tab. 2.1**

Používané hodnoty regeneračních potenciálů v prostředí BR pufru pro jednotlivá pH.

pH	$-E_{in}$ [mV]	$-E_{fin}$ [mV]
2	150	1050
3	100	1350
4	150	1350
5	100	1330
6	200	1350
7	200	1550
8	200	1550
9	250	1620
10	300	1650
11	330	1620
12	350	1700

#### 2.4.2 Visící rtuťová kapková elektroda

Byla používána visící rtuťová kapková elektroda typ UM $\mu$ E, výrobní číslo 00406, (EkoTrend-Plus, Praha). Velikost kapky byla dána otevřením ventilku po dobu 100 ms.

## 2.5 Pracovní postupy

Při voltametrických stanoveních bylo postupováno následujícím způsobem:

Do  $10 \text{ cm}^3$  odměrné baňky byl odpipetován příslušný objem zásobního roztoku BCNU o potřebné koncentraci v deionizované vodě a doplněno BR pufrem o příslušném pH na  $10 \text{ cm}^3$ .

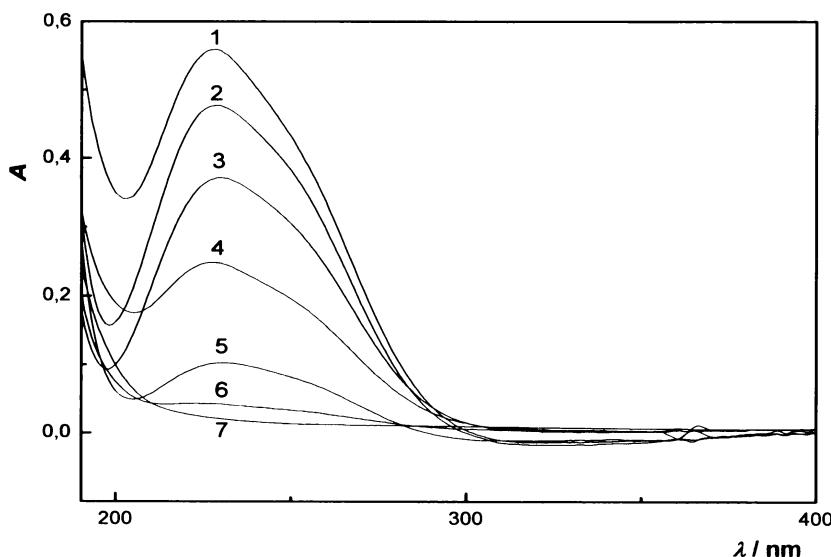
Takto připravený roztok byl po promíchání převeden do polarografické nádobky a zbaven kyslíku pětiminutovým probubláváním dusíkem. Před vstupem dusíku do nádobky byla zařazena promývačka obsahující deionizovanou vodu. Poté byl proveden záznam voltametrické křivky. Všechny křivky byly měřeny třikrát. Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty. Pro vyhodnocení opakovatelnosti je uváděna směrodatná odchylka a interval spolehlivosti  $L_{I,2}$  vypočtený na hladině významnosti 0,05 z rozpětí naměřených hodnot.

Mez stanovitelnosti ( $L_Q$ ) byla spočtena jako koncentrace látky, jejíž proudová odezva má hodnotu desetinásobku směrodatné odchylky tohoto stanovení.<sup>15</sup>

## 2.6 Stálost zásobního roztoku Carmustinu

Stálost zásobního roztoku BCNU o koncentraci  $1.10^{-3}$  mol dm $^{-3}$  v deionizované vodě byla sledována spektrofotometricky v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm. Referentní kyveta byla naplněna deionizovanou vodou. Absorbance zásobního roztoku byla měřena při vlnové délce  $\lambda_{max} = 228$  nm, při které studovaná látka vykazovala absorpční maximum. Hodnota molárního absorpčního koeficientu ( $\varepsilon$ ) při této vlnové délce činila  $5,588 \cdot 10^4$  mol $^{-1}$  dm $^3$  cm $^{-1}$ .

Absorpční spektra studované látky v průběhu měření stálosti zásobního roztoku jsou uvedena na Obr. 2.2. Výsledky měření stálosti zásobního roztoku jsou shrnuty v Tab. 2.2.



**Obr. 2.2**

*Absorpční spektrum roztoku BCNU ( $c = 1.10^{-3}$  mol dm $^{-3}$ ) v deionizované vodě.*

*Měřeno proti deionizované vodě v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm,*

*1.den (1), 2.den (2), 5.den (3), 10.den (4), 15.den (5), 22.den (6), 44.den (7).*

**Tab. 2.2**

*Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku BCNU o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> v deionizované vodě. Číselné hodnoty udávají relativní hodnotu absorbance v % proti hodnotě absorbance čerstvě připraveného roztoku ( $\lambda_{max} = 228$  nm). Měřeno proti deionizované vodě v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm.*

Dny	A <sub>228</sub>	%	Dny	A <sub>228</sub>	%
1	0,55877	100,0	11	0,15921	28,5
2	0,47681	85,3	12	0,17673	31,6
3	0,43912	78,6	15	0,10137	18,1
5	0,37018	66,2	17	0,08798	15,7
8	0,31134	55,7	22	0,04275	7,6
9	0,23668	42,4	29	0,02092	3,7
10	0,24891	44,5	44	0,02181	3,9

Z naměřených hodnot absorbance v Tab. 2.2 vyplývá, že BCNU je ve vodě nestálý, celkový pokles absorbance v průběhu 44 dnů činil cca 96 %. Nestálost BCNU ve vodních prostředích byla sledována již dříve<sup>16,17</sup>, kdy se BCNU za laboratorní teploty rozkládá za vzniku acetaldehydu a 2-chlorethylaminu včetně dusíku N<sub>2</sub> a oxidu uhličitého CO<sub>2</sub>, nejstabilněji se jeví roztoky při pH 5,2 – 5,5. Vzhledem k tomu, že pH samotného zásobního roztoku BCNU je 5,3, nebylo jeho pH ke zvýšení stability nijak upravováno.

V důsledku nestálosti zásobního roztoku BCNU byla měření prováděna v sériích trvajících maximálně tři dny a před proměřením každé série byl připravován vždy nový zásobní roztok BCNU.

### **3. Výsledky a diskuze**

V této kapitole byl za použití m-AgSAE a HMDE sledován vliv pH, naměřeny kalibrační závislosti s určením  $L_Q$  a změřena opakovatelnost pro nejvyšší a nejnižší dosaženou koncentraci.

### **3.1 Voltametrické stanovení Carmustinu na meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgamové elektrodě**

#### **3.1.1 DC voltametrie Carmustinu**

##### **3.1.1.1 Vliv pH**

Vliv pH na chování BCNU ( $c = 1.10^{-4}$  mol dm $^{-3}$ ) při DC voltametrii na m-AgSAE byl sledován v prostředí BR pufu o příslušném pH (2 – 12).

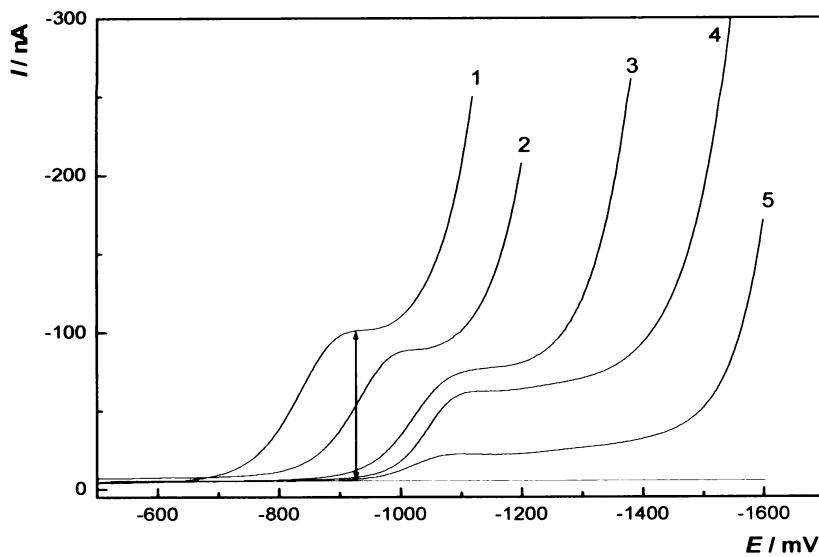
Zaznamenané voltametrické křivky ukazuje Obr. 3.1. Zjištěné závislosti limitního proudu  $I_{lim}$  a potenciálu  $E_v$  vlny na pH roztoku jsou uvedeny v Tab. 3.1. Graficky je závislost  $E_v$  na pH roztoku znázorněna na Obr. 3.2 a závislost  $I_{lim}$  na pH roztoku na Obr. 3.3. Zvolený způsob vyhodnocování vln je naznačen v Obr. 3.1 červenou čarou, založený na prodloužení základní linie.

Na změřených voltamogramech lze pozorovat jednu dobře vyvinutou vlnu. Potenciál vlny se s rostoucím pH až do pH 6 posouvá k negativním hodnotám, vzhledem k účasti H $^+$  iontů na redukci N-nitrososkupiny na hydroxylamin, od pH 7 je potenciál vlny téměř konstantní. S rostoucím pH zároveň docházelo k poklesu výšky vlny, od pH 11,0 nebyla již voltametrická vlna pozorována. Tento jev souvisí s malou stabilitou BCNU v alkalických prostředích.

Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu  $E_v$  vlny na pH BR pufu v rozmezí pH 2 – 6 vypočten vztah:

$$E_v \text{ [mV]} = -51,7 \text{ pH} - 819 \quad (\text{korelační koeficient: } -0,9744)$$

Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufr o pH 7,0, kdy látka poskytuje opakovatelné a vzhledem k maximálnímu rozdílu potenciálu redukce a úniku základního elektrolytu i snadno vyhodnotitelné vlny. Toto prostředí bylo použito pro měření kalibračních závislostí.



**Obr. 3.1**

Voltamogramy BCNU ( $c = 1.10^{-4}$  mol dm $^{-3}$ ) měřené technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o výsledném pH 2,2 (1); 3,0 (2); 5,0 (3); 7,0 (4); 9,0 (5).

**Tab. 3.1**

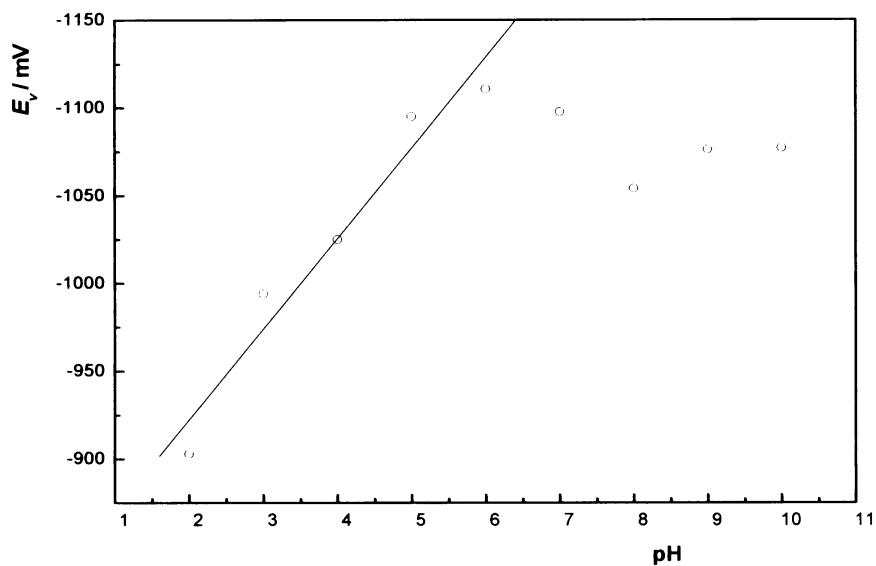
Vliv pH na DC voltamogramy BCNU ( $c = 1.10^{-4}$  mol dm $^{-3}$ ), měřeno v prostředí BR pufru.

pH	$-E_v$ [mV]	$-I_{lim}$ [nA]
2	903	94,11
3	994	78,95
4	1025	77,76
5	1095	68,60
6	1111	64,50
7	1098	54,86
8	1054	56,09
9	1076	16,43
10	1077	4,99
11	a	a
12	a	a

<sup>a</sup> – vlna není pozorovatelná

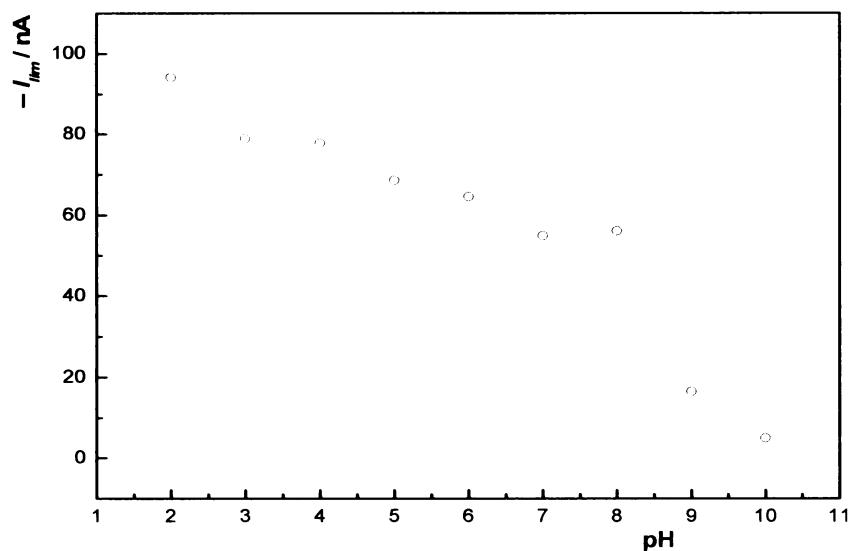
pH – pH použitého BR pufru

$E_v$  – potenciál vlny,  $I_{lim}$  – limitní proud vlny



**Obr. 3.2**

Závislost potenciálu  $E_v$  voltametrických vln BCNU ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na pH roztoku, měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru.



**Obr. 3.3**

Závislost limitního proudu  $I_{lim}$  voltametrických vln BCNU ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na pH roztoku, měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru.

### 3.1.1.2 Koncentrační závislost

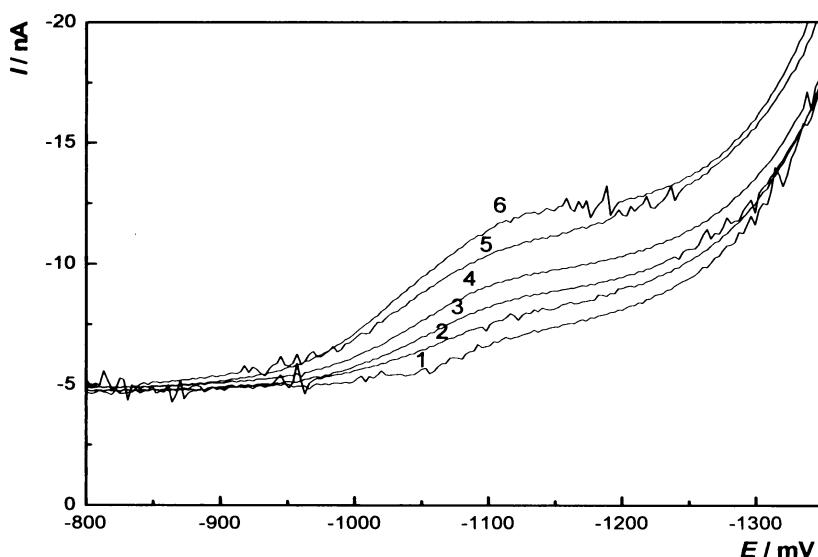
Koncentrační závislosti byly proměřeny metodou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0 v rozmezí  $(1 - 10).10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> a v rozmezí  $(2 - 10).10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> (viz Obr. 3.4, příslušná kalibrační závislost viz Obr. 3.5).

Pro koncentraci nižší než  $2.10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> již nebylo možno získané voltamogramy vyhodnotit.

Parametry kalibračních přímek pro stanovení BCNU v prostředí BR pufru o pH 7,0 jsou uvedeny v Tab. 3.2.

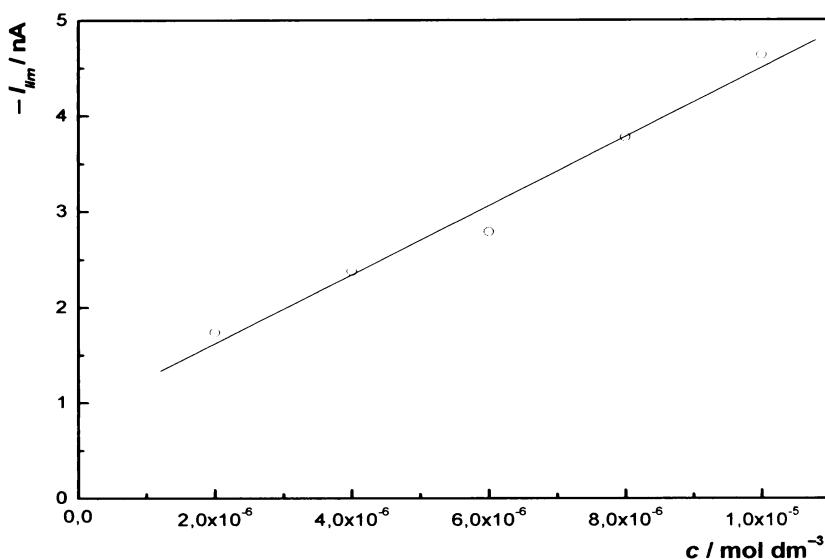
Při zvoleném pH 7,0 a největší proměřené koncentraci stanovované látky  $1.10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> a koncentraci  $4.10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> z nejnižšího dosaženého koncentračního řádu byla změřena opakovatelnost měření, kdy byla voltametrická křivka stanovované látky proměřena desetkrát. Byly používány regenerační potenciály  $E_{in} = -200$  mV a  $E_{fin} = -1550$  mV v souladu s Tab. 2.1.

Naměřená data byla statisticky vyhodnocena. Statistické vyhodnocení naměřených dat je uvedeno v Tab. 3.3.



**Obr. 3.4**

Voltamogramy BCNU měřené technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0 v nejnižším dosaženém koncentračním rozmezí.  $c(BCNU) = 0$  (1),  $2.10^{-6}$  (2),  $4.10^{-6}$  (3),  $6.10^{-6}$  (4),  $8.10^{-6}$  (5),  $1.10^{-5}$  (6) mol dm<sup>-3</sup>.



**Obr. 3.5**

Závislost limitního proudu  $I_{lim}$  na koncentraci BCNU v rozmezí  $2.10^{-6} - 1.10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ .

Měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0.

**Tab. 3.2**

Parametry kalibračních přímk pro stanovení BCNU metodou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0.

$c$ [mol dm <sup>-3</sup> ]	směrnice [nA mol <sup>-1</sup> dm <sup>3</sup> ]	úsek [nA]	korelační koeficient	$L_Q$ [mol dm <sup>-3</sup> ]
$(1 - 10) \cdot 10^{-5}$	$4,36 \cdot 10^5$	2,46	0,9798	—
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	$3,60 \cdot 10^5$	0,90	0,9899	$8 \cdot 10^{-7}$

**Tab. 3.3**

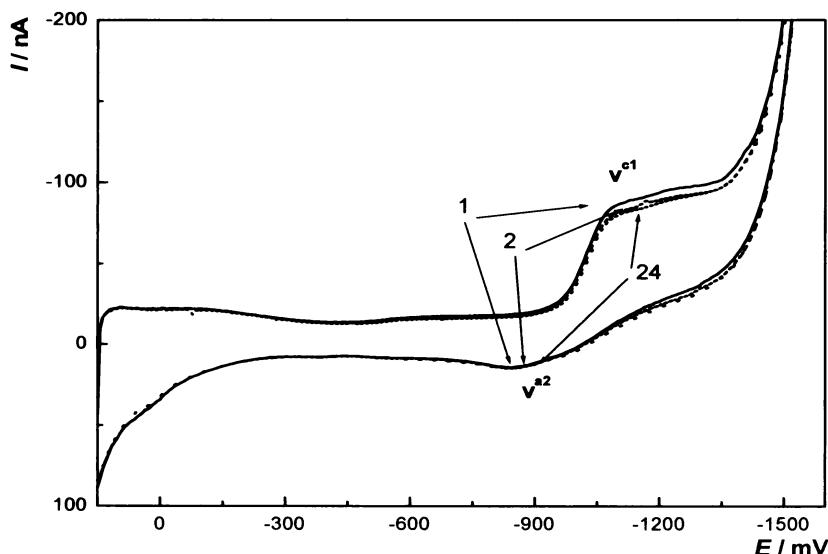
Opakovatelnost výšky vlny  $I_{lim}$  měřené DC voltametrií na m-AgSAE (vyhodnoceno z deseti záznamů)

$c$ [mol dm <sup>-3</sup> ]	$s$ [nA]	$s_r$ [%]	$L_{1/2}$
$1 \cdot 10^{-4}$	0,57	2,29	0,41
$4 \cdot 10^{-6}$	0,03	1,49	0,02

### 3.1.1.3 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie byla provedena v prostředí BR pufru o pH 7,0 při koncentraci BCNU  $1.10^{-4}$  mol dm $^{-3}$  ke studii elektrochemického chování BCNU na m-AgSAE v prostředí BR pufru. Zaznamenané voltametrické křivky jsou znázorněny na Obr. 3.6. Z obrázku je zřejmé, že během 24 cyklů nedošlo k výraznému poklesu výšky signálu BCNU.

V katodickém scanu se objevuje vlna  $v^{c1}$ . Z analogických studií<sup>6,7</sup> lze předpokládat, že odpovídá dvouelektronové redukci nitrososkupiny na hydroxylamin (Rov. 3.1). Nevýrazná anodická vlna  $v^{a2}$  při zpětném scanu nebyla identifikována. Vysvětlení mechanismu uvedených dějů by vyžadovalo podrobnější studii.



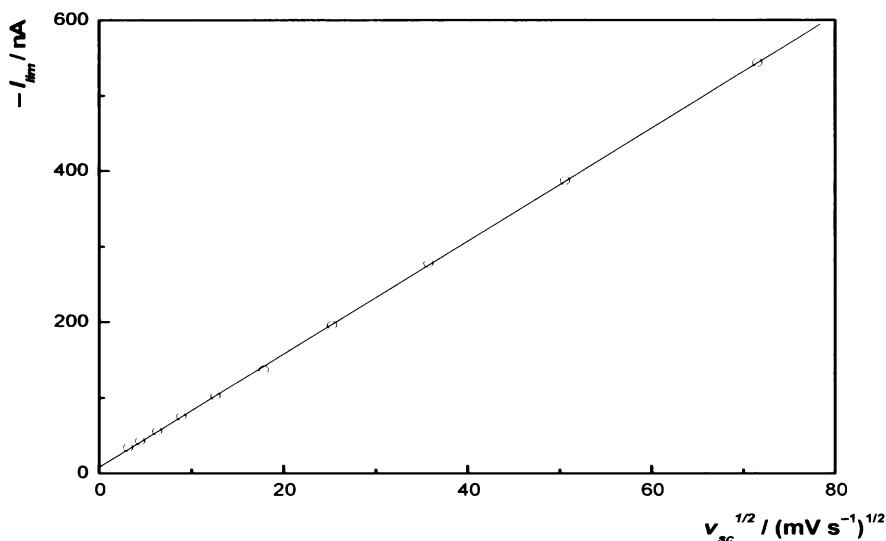
**Obr. 3.6**

*Voltamogramy BCNU ( $c = 1.10^{-4}$  mol dm $^{-3}$ ) měřené technikou CV na m-AgSAE v prostředí BR pufr o pH 7,0; 1. (-), 2. (---) a 24. (...) scan.*

### 3.1.1.4 Ověření difúzního charakteru limitního proudu

Pokud je velikost limitního proudu  $I_{lim}$  řízena difúzí BCNU k povrchu m-AgSAE, pak by závislost jeho velikosti na  $v_{sc}^{1/2}$  měla být lineární. Ke zjištění závislosti byly proměřeny voltametrické křivky pro rychlosti scanu:  $v_{sc} = 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2560$  a  $5120 \text{ mV s}^{-1}$ . Při každé rychlosti scanu byla měření provedena čtyřikrát.

Na Obr. 3.7 je vyhodnocena závislost limitního proudu  $I_{lim}$  na odmocnině z rychlosti scanu  $v_{sc}$ .



Obr. 3.7

Závislost limitního proudu  $I_{lim}$  BCNU na odmocnině z rychlosti scanu  $v_{sc}$ . Měřeno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0.

Z Obr. 3.7 je zřejmé, že závislost velikosti limitního proudu na odmocnině z rychlosti scanu je lineární, tento proud je tedy řízen difúzí a platí rovnice  $I_{lim} = \text{konst.} v_{sc}^{1/2}$ .

### **3.1.2 Diferenční pulsní voltametrie Carmustinu**

#### **3.1.2.1 Vliv pH**

Analogicky jako při DCV byl i technikou DPV sledován vliv pH na chování BCNU ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>) na m-AgSAE v prostředí BR pufru o příslušném pH (2 – 12).

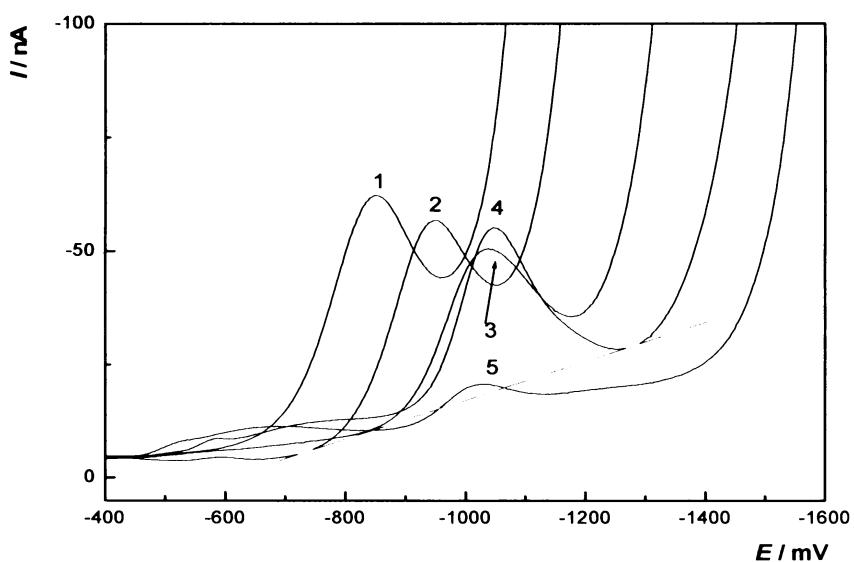
Zaznamenané voltametrické křivky ukazuje Obr. 3.8. Zjištěné závislosti potenciálu  $E_p$  a proudu  $I_p$  píku na pH roztoku jsou uvedeny v Tab. 3.4. Graficky je závislost  $E_p$  na pH roztoku znázorněna na Obr. 3.9 a závislost  $I_p$  na pH roztoku na Obr. 3.10. Zvolený způsob vyhodnocování píků je naznačen v Obr. 3.8 červenou čarou, je založený na spojení minim píků po obou stranách.

Na změřených voltamogramech lze pozorovat jeden pík. Potenciál píků se s rostoucím pH až do pH 6 posouvá k negativním hodnotám vzhledem k účasti H<sup>+</sup> iontů na redukci N-nitrososkopiny na hydroxylamin, od pH 7 je potenciál téměř konstantní. Výšky píku při pH 2 – 8 se pohybují kolem 30 nA, od pH 9 dochází k poklesu výšky. Od pH 10,0 nebyl již pík prakticky pozorovatelný. Tento jev souvisí opět s malou stabilitou BCNU v alkalických prostředích.

Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu píku  $E_p$  na pH BR pufru v rozmezí pH 2 – 6 vypočten vztah:

$$E_p [\text{mV}] = -53,1 \text{ pH} - 753,9 \quad (\text{korelační koeficient: } -0,9795)$$

Jako optimální bylo opět zvoleno prostředí BR pufr o pH 7,0 vzhledem k dostatečné výšce píku a posunu úniku základního elektrolytu k negativnějším potenciálům. Toto prostředí bylo použito pro měření kalibračních závislostí.



**Obr. 3.8**

Voltamogramy BCNU ( $c = 1.10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o výsledném pH 2,2 (1); 3,0 (2); 5,0 (3); 7,0 (4); 9,0 (5).

**Tab. 3.4**

Vliv pH na DP voltamogramy BCNU ( $c = 1.10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ), měřeno v prostředí BR pufru.

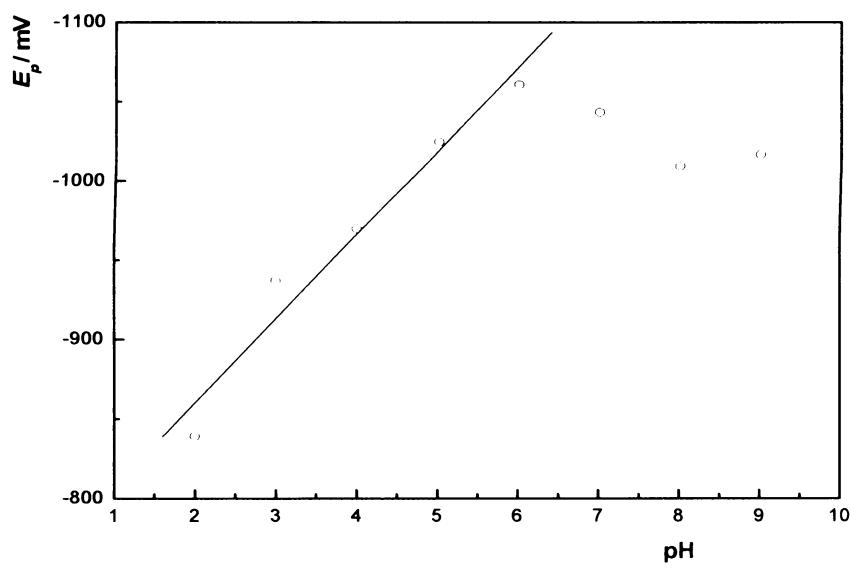
pH	$-E_p$ [mV]	$-I_p$ [nA]
2	839	31,77
3	937	28,24
4	970	31,36
5	1025	26,06
6	1061	29,22
7	1043	34,48
8	1009	40,43
9	1017	6,28
10	a	a
11	a	a
12	a	a

pH – pH použitého BR pufru

$E_p$  – potenciál píku

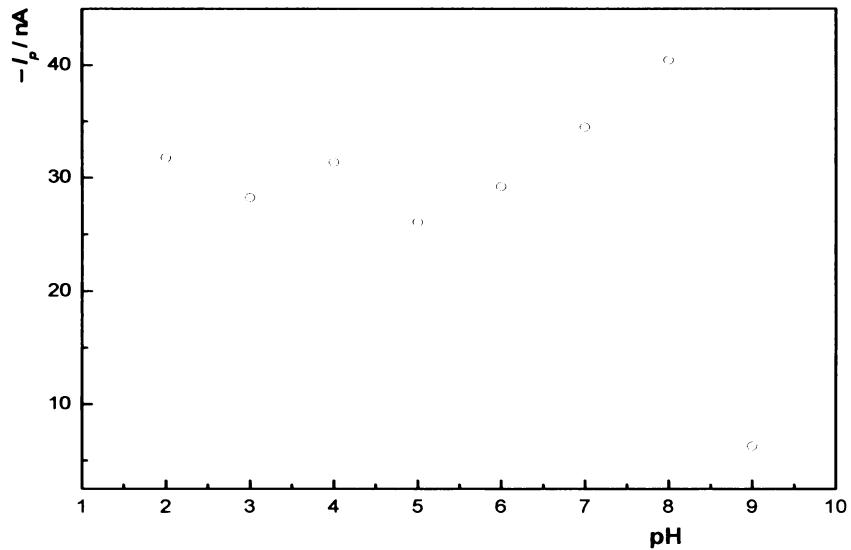
$I_p$  – proud píku

<sup>a</sup> – pík není pozorovatelný



**Obr. 3.9**

Závislost potenciálu píku  $E_p$  BCNU ( $c = 1.10^{-4}$  mol dm $^{-3}$ ) na pH roztoku, měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru.



**Obr. 3.10**

Závislost proudu píku  $I_p$  BCNU ( $c = 1.10^{-4}$  mol dm $^{-3}$ ) na pH roztoku, měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru.

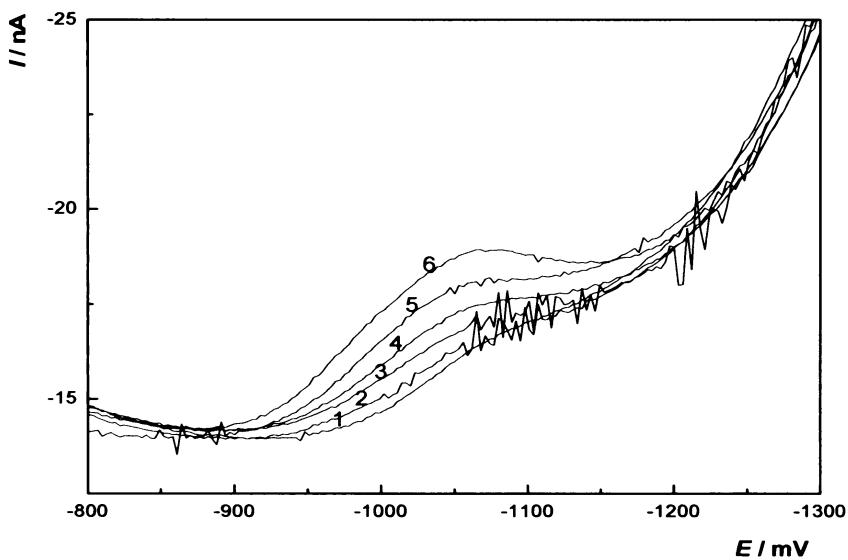
### 3.1.2.2 Koncentrační závislost

Koncentrační závislosti byly proměřeny metodou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0 v rozmezí  $(1 - 10).10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> a v rozmezí  $(2 - 10).10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> (viz Obr. 3.11, příslušná kalibrační závislost viz Obr. 3.12). Pro koncentraci nižší než  $2.10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> již nebylo možno získané voltamogramy vyhodnotit.

Parametry kalibračních přímek pro stanovení BCNU v prostředí BR pufru o pH 7,0 jsou uvedeny v Tab. 3.5.

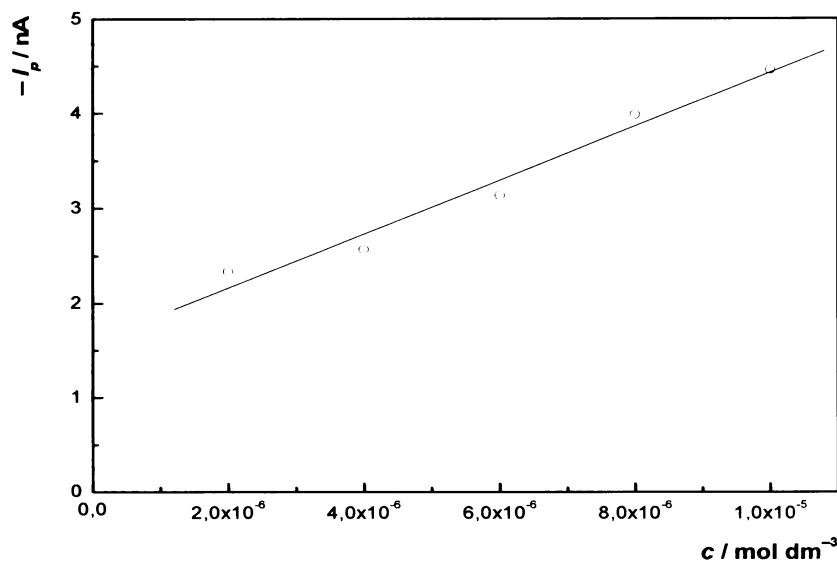
Při zvoleném pH 7,0 a největší proměřené koncentraci stanovované látky  $1.10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> a koncentraci  $4.10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> z nejnižšího dosaženého koncentračního rádu byla změřena opakovatelnost, přičemž voltametrická křivka stanovované látky byla proměřena desetkrát. Byly použity regenerační potenciály  $E_{in} = -200$  mV a  $E_{fin} = -1550$  mV v souladu s Tab. 2.1.

Naměřená data byla statisticky vyhodnocena. Statistické vyhodnocení naměřených dat je uvedeno v Tab. 3.6.



**Obr. 3.11**

Voltamogramy BCNU měřené technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0 v nejnižším dosaženém koncentračním rozmezí.  $c(BCNU) = 0$  (1),  $2.10^{-6}$  (2),  $4.10^{-6}$  (3),  $6.10^{-6}$  (4),  $8.10^{-6}$  (5),  $1.10^{-5}$  (6) mol dm<sup>-3</sup>.



**Obr. 3.12**

Závislost proudu píku  $I_p$  na koncentraci BCNU v rozmezí  $2.10^{-6} - 1.10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ .

Měřeno technikou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0.

**Tab. 3.5**

Parametry kalibračních přímek pro stanovení BCNU metodou DPV na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 7,0.

$c$ [mol dm <sup>-3</sup> ]	směrnice [nA mol <sup>-1</sup> dm <sup>3</sup> ]	úsek [nA]	korelační koeficient	$L_Q$ [mol dm <sup>-3</sup> ]
$(1 - 10).10^{-5}$	$2,82.10^5$	1,34	0,9778	—
$(2 - 10).10^{-6}$	$2,83.10^5$	1,60	0,9850	$7.10^{-7}$

**Tab. 3.6**

Opakovatelnost výšky píku  $I_p$  měřené DPV na m-AgSAE (vyhodnoceno z deseti záznamů)

$c$ [mol dm <sup>-3</sup> ]	$s$ [nA]	$s_r$ [%]	$L_{1/2}$
$1.10^{-4}$	0,24	1,94	0,17
$4.10^{-6}$	0,02	1,37	0,01

## **3.2 Voltametrické stanovení Carmustinu na visící rtuťové kapkové elektrodě**

### **3.2.1 DC voltametrie Carmustinu**

#### **3.2.1.1 Vliv pH**

V článku<sup>7</sup>, ve kterém byl BCNU stanovován diferenční pulsní polarografií, se vedle jednoduché vlny BCNU objevila též druhá vlna. Jak vyplývá z kapitoly 3.1 tento druhý signál není na m-AgSAE pozorovatelný. Proto byla v práci použita vedle m-AgSAE pro porovnání visící rtuťová kapková elektroda, která taktéž k systematickému studiu chování BCNU použita nebyla, k nalezení této vlny z důvodu větší citlivosti HMDE.

Vliv pH na chování BCNU ( $c = 1.10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>) při DCV na HMDE byl sledován v prostředí BR pufru o příslušném pH (2 – 12).

Zaznamenané voltametrické křivky ukazuje Obr. 3.13. Zjištěné závislosti proudu  $I_p$  píku a potenciálu  $E_p$  píku na pH roztoku jsou uvedeny v Tab. 3.7. Graficky je závislost  $E_p$  na pH roztoku znázorněna na Obr. 3.14 a závislost  $I_p$  na pH roztoku na Obr. 3.15.

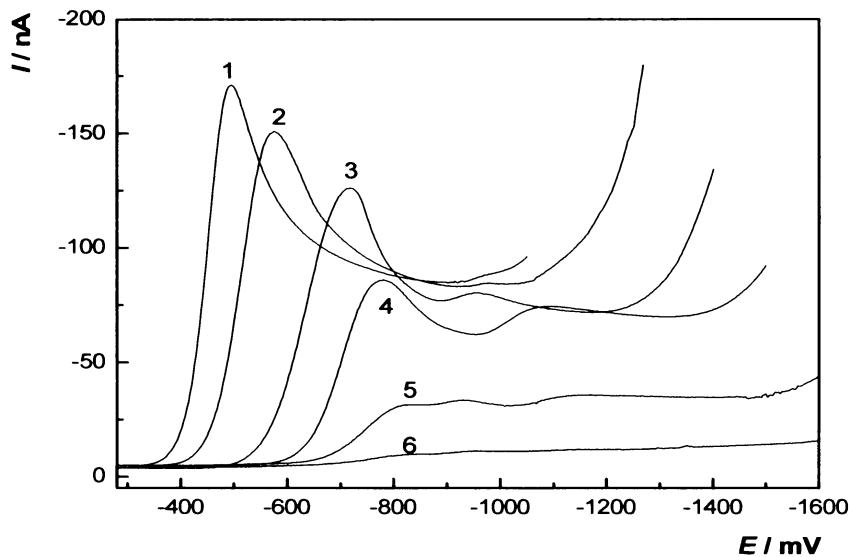
Na změřených voltamogramech lze narozdíl od m-AgSAE pozorovat 1 – 2 píky či vlny, kdy druhý pík je výrazně nižší než první. Při pH 2 až 4 lze rozlišit 1 pík, při pH 5 – 9 jsou pozorovatelné 2 píky a od pH 11 nebyl již voltametrický pík prakticky pozorován. Tento jev souvisí opět s malou stabilitou BCNU v alkalických prostředích. Narozdíl od m-AgSAE se potenciál prvního píku s rostoucím pH posouvá k negativním hodnotám v celém rozsahu pH 2 – 12, tento posun lze popsat rovnicí:

$$E_p \text{ [mV]} = -42 \text{ pH} - 464,31 \quad (\text{korelační koeficient: } -0,9581)$$

Zaznamenaný posun potenciálu  $E_p$  píku s rostoucím pH i v oblasti neutrálních a zásaditých pH svědčí o odlišnostech v mechanismu redukce BCNU na rtuťových elektrodách v porovnání s m-AgSAE. Zároveň byl pozorován velký rozdíl potenciálů pro redukci BCNU na m-AgSAE a HMDE, který pro prostředí BR pufru o pH 2 – 7 činil cca 400 mV.

S rostoucím pH zároveň docházelo k poklesu výšky píku.

Navíc vzhledem ke zmiňovanému posunu  $E_p$  k pozitivnějším potenciálům také nedochází k interferenci signálu s únikem základního elektrolytu jako v případě m-AgSAE. Toto prostředí bylo použito pro měření kalibračních závislostí.



**Obr. 3.13**

*Voltamogramy BCNU ( $c = 1.10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) měřené technikou DCV na HMDE v prostředí BR pufru o výsledném pH 2,2 (1); 3,0 (2); 5,0 (3); 7,0 (4); 9,0 (5); 10,0 (6).*

**Tab. 3.7**

*Vliv pH na DC voltamogramy BCNU ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), měřeno v prostředí BR pufru.*

pH	$-E_p^1$ [mV]	$-I_p^1$ [nA]	$-E_p^2$ [mV]	$-I_p^2$ [nA]
2	493,25	158,98	b	b
3	569,25	139,00	b	b
4	670,00	127,38	b	b
5	715,00	122,03	961	78,19
6	741,25	94,12	1004	70,04
7	776,67	79,08	1098	62,08
8	805,50	49,87	927	44,02
9	834,60	25,17	930	28,25
10	841,00	5,62	b	b
11	a	a	b	b
12	a	a	b	b

pH – pH použitého BR pufru

$E_p^1$  – potenciál 1. píku

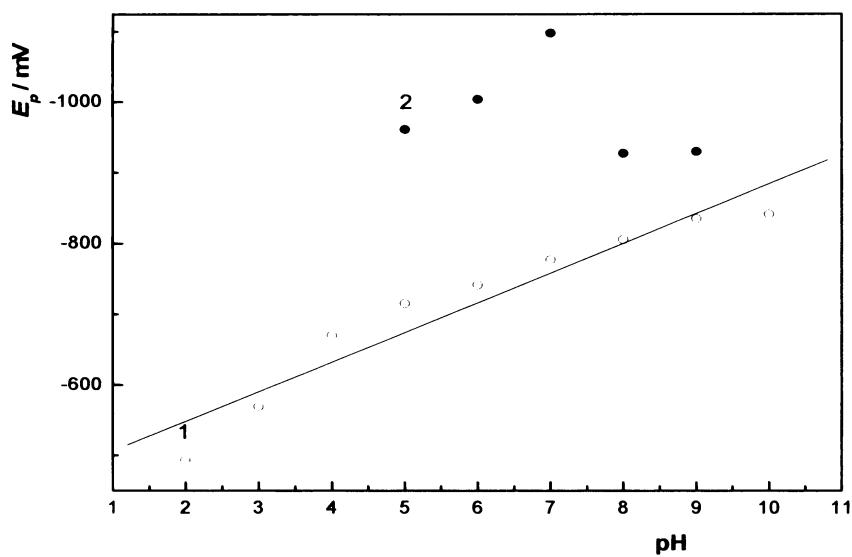
$I_p^1$  – proud 1. píku

$E_p^2$  – potenciál 2. píku

$I_p^2$  – proud 2. píku

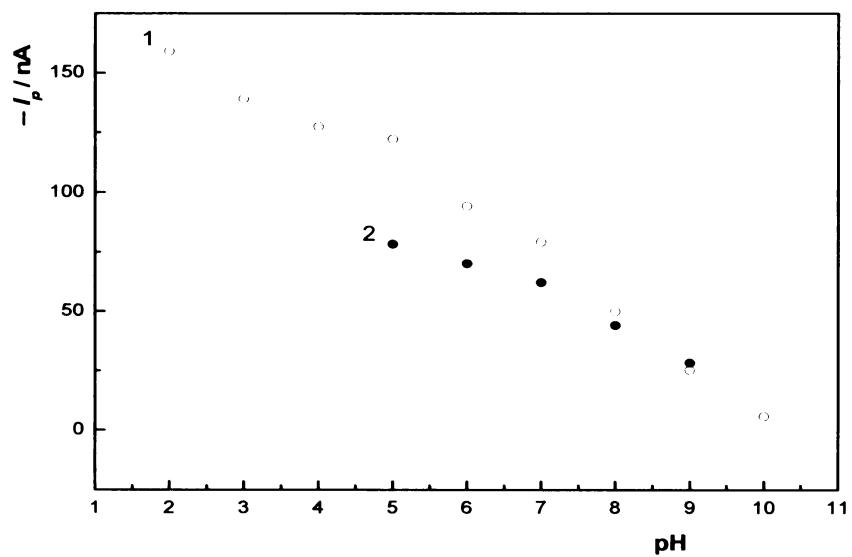
<sup>a</sup> – 1. pík není pozorovatelný

<sup>b</sup> – 2. pík není pozorovatelný



Obr. 3.14

Závislost potenciálu  $E_p$  voltametrických píků BCNU ( $c = 1.10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na pH roztoku, měřeno technikou DCV na HMDE v prostředí BR pufru, 1 – 1. pik, 2 – 2. pik.



Obr. 3.15

Závislost proudu  $I_p$  voltametrických píků BCNU ( $c = 1.10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na pH roztoku, měřeno technikou DCV na HMDE v prostředí BR pufr, 1 – 1. pik, 2 – 2. pik.

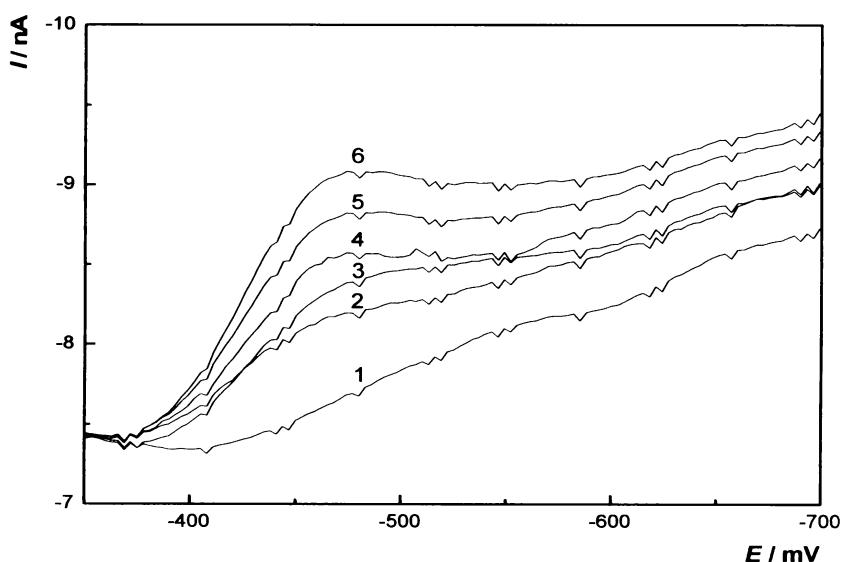
### 3.2.1.2 Koncentrační závislost

Koncentrační závislosti byly proměřeny metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 2,2 v rozmezí  $(1 - 10).10^{-5}$  mol dm $^{-3}$ , v rozmezí  $(2 - 10).10^{-6}$  mol dm $^{-3}$  a v rozmezí  $(2 - 10).10^{-7}$  mol dm $^{-3}$  (viz Obr. 3.16, příslušná kalibrační závislost viz Obr. 3.17), kdy již druhý pík nebyl pozorovatelný. Pro koncentraci nižší než  $2.10^{-7}$  mol dm $^{-3}$  již nebylo možno získané voltamogramy vyhodnotit.

Parametry kalibračních přímek pro stanovení BCNU v prostředí BR pufru o pH 2,2 jsou uvedeny v Tab. 3.8.

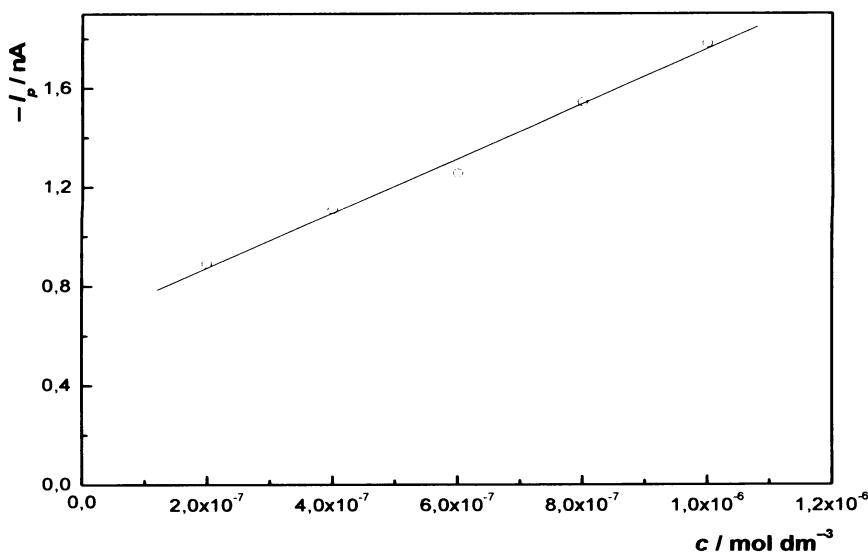
Při zvoleném pH 2,2 a největší proměřené koncentraci stanovované látky  $1.10^{-4}$  mol dm $^{-3}$  a koncentraci  $6.10^{-7}$  mol dm $^{-3}$  z nejnižšího dosažitelného koncentračního rádu byla změřena opakovatelnost měření, kdy byla voltametrická křivka stanovované látky proměřena desetkrát.

Naměřená data byla statisticky vyhodnocena. Statistické vyhodnocení naměřených dat je uvedeno v Tab.3.9.



**Obr. 3.16**

Voltamogramy BCNU měřené technikou DCV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 2,2 v nejnižším dosaženém koncentračním rozmezí.  $c(BCNU) = 0$  (1),  $2.10^{-7}$  (2),  $4.10^{-7}$  (3),  $6.10^{-7}$  (4),  $8.10^{-7}$  (5),  $1.10^{-6}$  (6) mol dm $^{-3}$ .



**Obr. 3.17**

Závislost proudu  $I_p$  voltametrického píku na koncentraci BCNU v rozmezí  $2.10^{-7} - 1.10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . Měřeno technikou DCV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 2,2.

**Tab. 3.8**

Parametry kalibračních přímek pro stanovení BCNU metodou DCV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 2,2.

$c$ [mol dm <sup>-3</sup> ]	směrnice [nA mol <sup>-1</sup> dm <sup>3</sup> ]	úsek [nA]	korelační koeficient	$L_Q$ [mol dm <sup>-3</sup> ]
$(1 - 10).10^{-5}$	$1,79.10^6$	- 0,99	0,9997	—
$(2 - 10).10^{-6}$	$1,79.10^6$	- 0,54	0,9979	—
$(2 - 10).10^{-7}$	$1,11.10^6$	0,65	0,9954	$3,6.10^{-7}$

**Tab. 3.9**

Opakovatelnost výšky píku  $I_p$  měřené DC voltametrií na HMDE (vyhodnoceno z deseti záznamů)

$c$ [mol dm <sup>-3</sup> ]	$s$ [nA]	$s_r$ [%]	$L_{1/2}$
$1.10^{-4}$	0,72	0,49	0,51
$6.10^{-7}$	0,04	3,30	0,03

### 3.2.2 Diferenční pulsní voltametrie Carmustinu

#### 3.2.2.1 Vliv pH

Analogicky jako při DCV byl i technikou DPV sledován vliv pH na chování BCNU ( $c = 1.10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>) na HMDE v prostředí BR pufru o příslušném pH (2 – 12).

Zaznamenané voltametrické křivky ukazuje Obr. 3.18. Zjištěné závislosti proudu  $I_p$  a potenciálu  $E_p$  píku na pH roztoku jsou uvedeny v Tab. 3.10. Graficky je závislost  $E_p$  na pH roztoku znázorněna na Obr. 3.19 a závislost  $I_p$  na pH roztoku na Obr. 3.20.

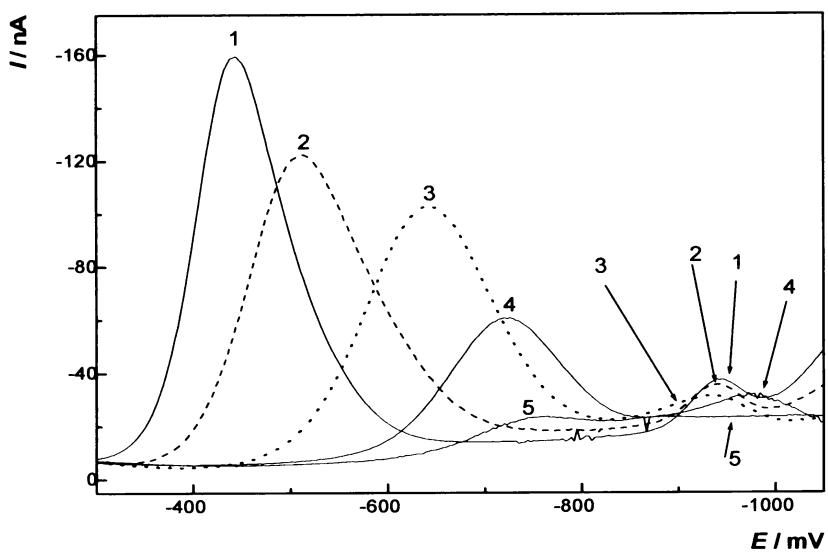
Na změřených voltamogramech lze pozorovat 1 – 2 píky. Vzhledem k větší citlivosti DPV v porovnání s DC voltametrií lze druhý, znatelně menší pík pozorovat již od pH 2 do pH 8. Při pH 2 až 8 lze pozorovat 2 píky, při pH 9 lze rozlišit 1 pík a od pH 10 nebyl již voltametrický pík prakticky pozorovatelný.

Potenciál prvního píku  $E_p^1$  se s rostoucím pH posouvá k negativním hodnotám, potenciál druhého píku  $E_p^2$  je konstantní. S rostoucím pH zároveň docházelo k poklesu výšky prvního píku, výšky druhého píku jsou téměř konstantní.

Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu  $E_p^1$  prvního píku na pH BR pufru v rozmezí pH 2 – 12 vypočten vztah:

$$E_p^1 \text{ [mV]} = -41,6 \text{ pH} - 409,2 \quad (\text{korelační koeficient: } -0,9479)$$

Jako optimální bylo opět zvoleno prostředí BR pufr o pH 2,2. Toto prostředí bylo použito pro měření kalibračních závislostí.



**Obr. 3.18**

Voltamogramy BCNU ( $c = 1.10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) měřené technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufru o výsledném pH 2,2 (1); 3,0 (2); 5,0 (3); 7,0 (4); 9,0 (5).

**Tab. 3.10**

Vliv pH na DP voltamogramy BCNU ( $c = 1.10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ), měřeno v prostředí BR pufru.

pH	$-E_p^I$ [mV]	$-I_p^I$ [nA]	$-E_p^2$ [mV]	$-I_p^2$ [nA]
2	446,25	144,78	940,00	10,93
3	514,00	109,15	937,00	11,49
4	622,30	93,54	919,30	10,23
5	646,70	89,52	930,30	12,94
6	677,30	73,09	950,00	15,72
7	720,30	52,32	971,30	24,49
8	734,60	20,53	880,40	6,34
9	741,00	6,29	b	b
10	a	a	b	b
11	a	a	b	b
12	a	a	b	b

pH – pH použitého BR pufuru

$E_p^1$  – potenciál 1. píku

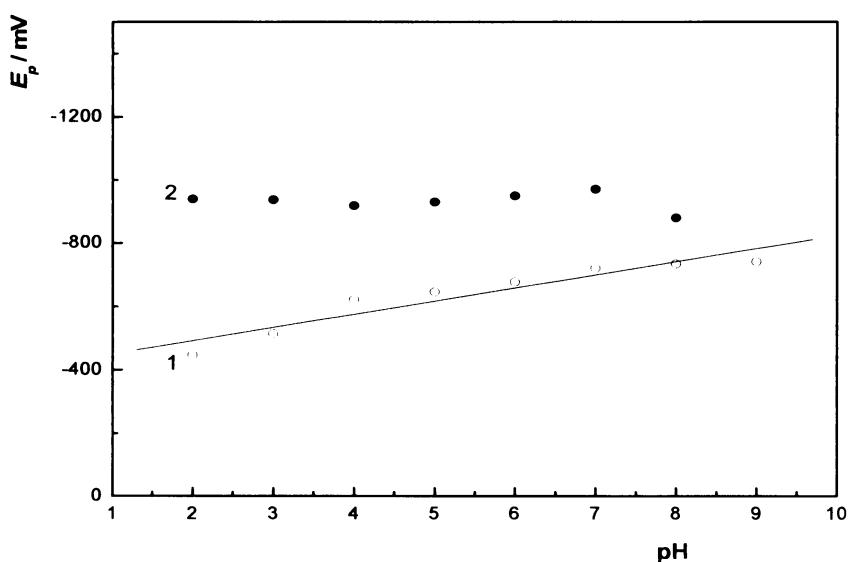
$I_p^1$  – proud 1. píku

$E_p^2$  – potenciál 2.píku

$I_p^2$  – proud 2. píku

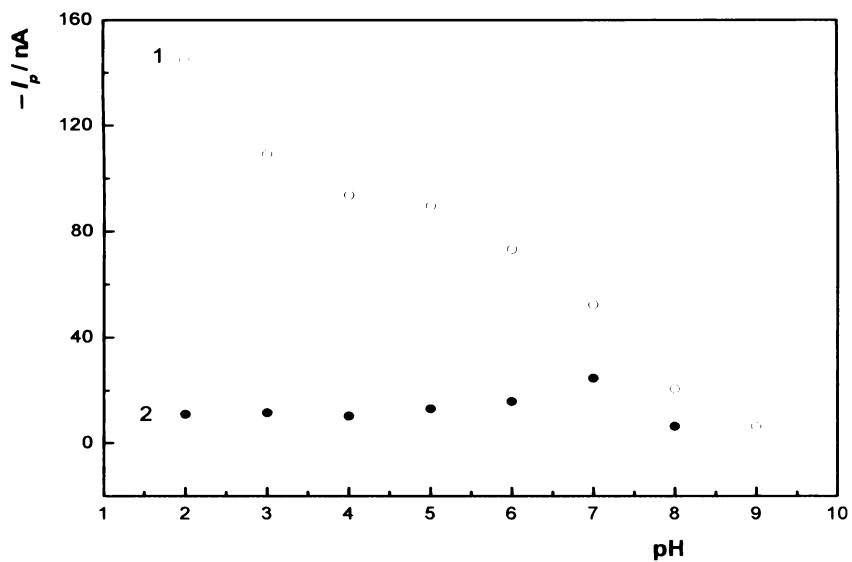
<sup>a</sup> – 1. pík není pozorovatelný

<sup>b</sup> – 2. pík není pozorovatelný



Obr. 3.19

Závislost potenciálu  $E_p$  voltametrických píků BCNU ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na pH roztoku, měřeno technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufuru, 1 – 1. pík, 2 – 2. pík.



**Obr. 3.20**

Závislost proudu  $I_p$  voltametrických píků BCNU ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na pH roztoku, měřeno technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufr, 1 – 1.pík, 2 – 2.pík.

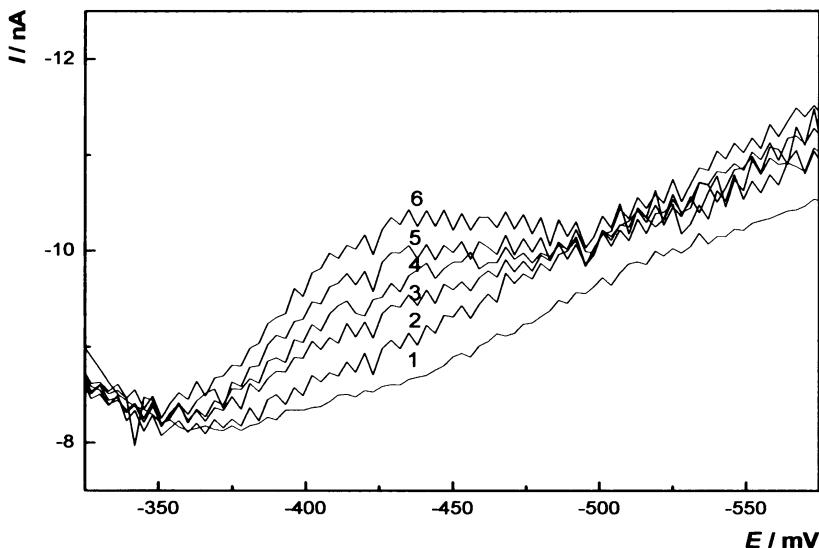
### 3.2.2.2 Koncentrační závislost

Koncentrační závislosti byly proměřeny metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 2,2 v rozmezí  $(1 - 10) \cdot 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>, v rozmezí  $(2 - 10) \cdot 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> a v rozmezí  $(2 - 10) \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> (viz Obr. 3.21, příslušná kalibrační závislost viz Obr. 3.22), kdy již druhý pík nebyl pozorovatelný. Pro koncentraci nižší než  $2 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> již nebylo možno získané voltamogramy vyhodnotit.

Parametry kalibračních přímek pro stanovení BCNU v prostředí BR pufru o pH 2,2 jsou uvedeny v Tab. 3.11.

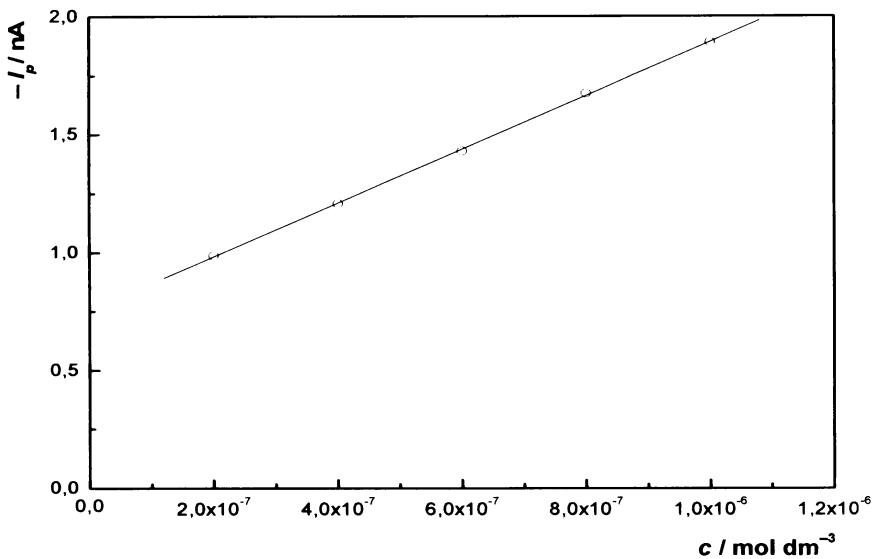
Při zvoleném pH 2,2 a největší proměřené koncentraci stanovované látky  $1 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> a koncentraci  $6 \cdot 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> z nejnižšího dosaženého koncentračního rádu byla změřena opakovatelnost měření, přičemž byla voltametrická křivka stanovované látky proměřena desetkrát.

Naměřená data byla statisticky vyhodnocena. Statistické vyhodnocení naměřených dat je uvedeno v Tab. 3.12.



**Obr. 3.21**

Voltamogramy BCNU měřené technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 2,2.  
 $c(BCNU) = 0$  (1),  $2 \cdot 10^{-7}$  (2),  $4 \cdot 10^{-7}$  (3),  $6 \cdot 10^{-7}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5),  $1 \cdot 10^{-6}$  (6) mol dm<sup>-3</sup>.



**Obr. 3.22**

Závislost proudu píku  $I_p$  na koncentraci BCNU v rozmezí  $2.10^{-7} - 1.10^{-6}$  mol  $dm^{-3}$ . Měřeno technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 2,2.

**Tab. 3.11**

Parametry kalibračních přímek pro stanovení BCNU metodou DPV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 2,2.

$c$ [mol $dm^{-3}$ ]	směrnice [nA mol $^{-1}$ $dm^3$ ]	úsek [nA]	korelační koeficient	$L_Q$ [mol $dm^{-3}$ ]
$(1 - 10).10^{-5}$	$2,34.10^6$	- 1,35	0,9995	—
$(2 - 10).10^{-6}$	$2,43.10^6$	- 0,60	0,9974	—
$(2 - 10).10^{-7}$	$1,14.10^6$	0,76	0,9998	$6,2.10^{-7}$

**Tab. 3.12**

Opakovatelnost výšky píku  $I_p$  měřené DPV na HMDE (vyhodnoceno z deseti záznamů)

$c$ [mol $dm^{-3}$ ]	$s$ [nA]	$s_r$ [%]	$L_{I/2}$
$1.10^{-4}$	1,17	0,62	0,83
$6.10^{-7}$	0,07	1,88	0,05

## 4. Závěr a diskuse

V práci bylo prostudováno spektrofotometrické chování BCNU ve vodném prostředí, přičemž byla potvrzena jeho nestálost. V používaných lékových formách je BCNU prokazatelně stálý a při jejich analýze je třeba vždy připravovat čerstvé roztoky z dostupných standardů a léčiv, proto není dlouhodobá nestabilita BCNU ve vodných roztocích limitujícím faktorem pro jeho stanovení.

V práci bylo studováno chování BCNU na meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgamové elektrodě a visící rtuťové kapkové elektrodě pomocí DCV a DPV. Bylo zjištěno, že se elektrochemické chování BCNU liší: na HMDE látka poskytuje v prostředí BR pufru 1 až 2 píky či vlny, jejichž poloha a výška závisí na pH použitého pufru, na m-AgSAE je pozorovatelný pouze 1 pík v celém rozsahu pH (2 – 10).

Shrnuté výsledky měření jsou uvedeny v Tab. 4.1. Z Tab. 4.1 je zřejmé, že nižších hodnot relativní směrodatné odchyly bylo dosaženo na HMDE, nicméně relativní směrodatná odchylka 2,29 % u m-AgSAE svědčí o možném použití této elektrody v praktických aplikacích.

Byly nalezeny optimální podmínky pro jeho stanovení v koncentračním rozmezí  $1.10^{-4}$  až  $2.10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>, koncentračního řádu  $10^{-7}$  bylo dosaženo použitím visící rtuťové kapkové elektrody.

**Tab. 4.1**

Shrnuté výsledky měření.

	m-AgSAE			HMDE		
	c [mol dm <sup>-3</sup> ]	s <sub>r</sub> [%]	L <sub>Q</sub> [mol dm <sup>-3</sup> ]	c [mol dm <sup>-3</sup> ]	s <sub>r</sub> [%]	L <sub>Q</sub> [mol dm <sup>-3</sup> ]
DCV	$1.10^{-4}$	2,29	–	$1.10^{-4}$	0,49	–
DPV	$1.10^{-4}$	1,49	–	$1.10^{-4}$	0,62	–
DCV	$4.10^{-6}$	1,94	$8,3.10^{-7}$	$6.10^{-7}$	3,30	$3,6.10^{-7}$
DPV	$4.10^{-6}$	1,37	$7,1.10^{-7}$	$6.10^{-7}$	1,88	$6,2.10^{-7}$

## Seznam použité literatury

1. Hampl, F., Paleček, J.: *Farmakochemie*. VŠCHT Praha 2002.
2. Klener, P.: *Chemoterapie v komplexní léčbě zhoubných nádorů a hemoblastóz*. Avicenum 1987
3. Bezpečnostní list Carmustinu (11/24/2006), Praha, Sigma – Aldrich 2006.  
URL: <http://www.sigmaaldrich.com> [cit.25.3.2007].
4. URL: <http://www.iarc.fr> [cit 30.4.2007].
5. URL: <http://www.sukl.cz> [cit 25.3.2007].
6. Snyderski, A.; Fijalek, Z.: *Chemia Analityczna* 41, 1025 (1996).
7. Bartošek, I.; Daniel, S.; Sýkora, S.: *J. Pharm. Sci.* 67, 1160 (1978)
8. Hassenbusch, S. J.; Colvin, O. M.; Anderson, J. H.: *J. Pharm. Sci.* 84, 840 (1995).
9. Český lékopis 2005, Doplněk 2006, Grada Publishing, a.s. 2006
10. Yosypchuk, B.; Novotný, L.: *Chem. listy* 96, 756 (2002).
11. Daňhel, A.; Pecková, K.; Čížek, K.; Barek, J.; Zima, J.; Yosypchuk, B.; Navrátil, T.: *Chem. listy* 101, 144 (2007).
12. Barek, J.; Opekar, F.; Štulík, K.: *Elektroanalytická chemie*. Praha, Nakladatelství Karolinum 2005.
13. Sýkora, V.; Zátka, V.: *Příruční tabulky pro chemiky*. SNTL Praha 1967.
14. URL: <http://chem.srs.nlm.nih.gov/chemidplus/> [cit 30.4.2007].
15. Eckschleger, K.: *Chemometrie*. Praha, Univerzita Karlova, vydavatelství Karolinum 1991, s. 108
16. Laskar, P. A.; Ayres, J. W.: *J. Pharm. Sci.* 66, 1073 (1977).
17. Fredriksson, K.; Lundgren, P.; Landersjö, L.: *Acta Pharm. Suec.* 23, 115 (1986)