

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie

---

Bakalářská práce  
KATA

## **STANOVENÍ BENZOKAINU POMOCÍ HPLC–ED**

Veronika Vokálová

Vedoucí bakalářské práce:  
Doc. RNDr. Jiří Zima, CSc.

Praha 2007

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Jiřího Zimy, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne 1.6.2007.

*Kokalova Teronika*  
.....  
podpis

*Úvodem své bakalářské práce bych chtěla poděkovat všem, kteří mi vytvořili podmínky pro její vypracování, zejména vedoucímu práce Doc. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc. za jeho trpělivost a poskytnuté konzultace při sepisování. V neposlední řadě děkuji rodičům za jejich důvěru a podporu při studiu.*

*Veronika Vokálová*

Tato práce byla finančně podporována MŠMT ČR (projekt MSM 0021620857 a projekt LC06035).

# Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	6
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	7
1.1 Cíl práce .....	7
1.2 Benzokain jako lokální anestetikum .....	8
1.3 Metody stanovení benzokainu .....	8
1.3.1 Lékopisné stanovení obsahu .....	8
1.3.2 Využití metody HPLC .....	9
1.3.2.1 Stanovení metodou RP-HPLC s UV detekcí .....	9
1.3.2.2 Analýza metodou HPLC s ED a UV detekcí .....	10
1.3.3 Ostatní metody stanovení benzokainu .....	10
1.4 Uhlíková pastová elektroda .....	12
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	14
2.1 Použité chemikálie .....	14
2.2 Použitá aparatura .....	15
2.3 Ostatní použitá zařízení .....	15
2.4 Studovaná látka – benzokain .....	16
2.5 Použité vzorce .....	17
2.6 Pracovní postupy .....	17
2.6.1 Stálost zásobního roztoku benzokainu .....	17
2.6.2 HPLC stanovení benzokainu .....	17
2.6.2.1 HPLC stanovení benzokainu s UV detekcí .....	18
2.6.2.2 HPLC stanovení benzokainu s elektrochemickou detekcí .....	18

3	VÝSLEDKY A DISKUSE .....	19
3.1	Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku benzokainu ...	19
3.2	HPLC s elektrochemickou a UV detekcí .....	21
3.2.1	Optimalizace podmínek .....	21
3.2.1.1	<i>Vliv pH mobilní fáze na retenční chování</i> .....	21
3.2.1.2	<i>Hydrodynamické voltamogramy</i> .....	22
3.2.2	Kalibrační závislosti .....	24
3.2.2.1	<i>Spektrofotometrická detekce</i> .....	24
3.2.2.2	<i>Elektrochemická detekce</i> .....	27
3.2.3	Opakovatelnost elektrochemické detekce .....	30
4	ZÁVĚR .....	33
	LITERATURA .....	34

## Seznam použitých zkratek

$A$	absorbance
$A_P$	plocha píku
AU, mAU	jednotky absorbance
$c$	koncentrace
CAS	Chemical Abstract Services
CPE(s)	uhlíková pastová elektroda (Carbon Paste Electrode(s))
ED	elektrochemická detekce
$E_{prac}$	potenciál vložený na pracovní elektrodu
$h_P$	výška píku
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
$I$	proud
$k$	retenční faktor
$\lambda$	vlnová délka
$L_D$	mez detekce
$\log k$	dekadický logaritmus retenčního faktoru
MeOH	methanol
$M_r$	relativní molární hmotnost
p.a.	pro analýzu
$\rho$	hustota
$R^2$	druhá mocnina korelačního koeficientu
RP-18	reverzní fáze s chemicky vázaným oktadecylsilanem
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
$s$	směrodatná odchylka
$s_r$	relativní směrodatná odchylka
SCE	nasycená kalomelová elektroda
$t$	čas
$t_M$	mrtvý čas
$t_R$	retenční čas
$T_i$	teplota tání
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Cíl práce

Předkládaná bakalářská práce se zabývá studiem chromatografického chování benzokainu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC).

Cílem této práce bylo prozkoumání, nalezení a následné využití optimálních podmínek pro stanovení studované látky amperometrickou detekcí na uhlíkové pastové elektrodě (CPE) k dosažení co nejnižší meze detekce.

Benzokain patří mezi hojně používané lokální anestetikum, a tak je nutné vyvinout metody umožňující jeho stanovení v nízkých koncentracích.

## 1.2 Benzokain jako lokální anestetikum<sup>1</sup>

Benzokain patří do skupiny anestetik označovaných jako lokální anestetika esterového typu. Princip účinku lokálních anestetik spočívá v potlačení nebo úplné blokádě šíření nervového vzruchu reverzibilním zablokováním receptorů sodíkových kanálů v neuronálních membránách.

Znecitlivění tkáně vyvolané lokálními anestetiky se využívá především při menších chirurgických a stomatologických zákrocích. Schopnosti lokálních anestetik znecitlivovat tkáně se využívá i v preparátech používaných při bolestech dutiny ústní, krku a podobně.

Prvními syntetickými lokálními anestetiky byly estery kyseliny 4-aminobenzoové, mezi které patří právě i benzokain. Benzokain byl objeven již v roce 1892 a dodnes se používá jako povrchové anestetikum v různých přípravcích pro zevní použití (zásypy, masti, čípky).

## 1.3 Metody stanovení benzokainu

### 1.3.1 Lékopisné stanovení obsahu<sup>2</sup>

0,400 g benzokainu se rozpustí ve směsi 25 ml kyseliny chlorovodíkové a 50 ml vody a provede se stanovení dusíku v primárních aromatických aminech. 1 ml dusitanu sodného  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  odpovídá 16,52 mg  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$ .



## 1.3.2 Využití metody HPLC

### 1.3.2.1 Stanovení metodou RP-HPLC s UV detekcí

Nejčastěji používanou metodou stanovení benzokainu je vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC) s UV detekcí. Jelikož se benzokain stanovuje především v různých farmaceutických přípravcích, bývá většinou toto stanovení prováděno současně se stanovením dalších důležitých látek, jež jsou v daném přípravku také obsaženy (simultánní stanovení). Zde je uvedeno jen několik příkladů tohoto způsobu stanovení benzokainu.

Stanovení benzokainu současně se stanovením rutinu s UV detekcí při 270 nm bylo prováděno v čípcích, které byly nejprve extrahovány methanolem. Jako mobilní fáze byla zvolena vodná složka s obsahem triethylaminu o pH 3 a methanol v poměru 43:57 (v/v). Byla použita kolona Apex ODS (5  $\mu\text{m}$ ). Linearita odezvy kalibračních roztoků byla proměřována v rozmezí 1,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  až 3,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a byla potvrzena v celém intervalu. V čípcích bylo dosaženo meze detekce 0,22  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a meze stanovitelnosti 0,67  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .<sup>3</sup>

Z důvodu blížícího se uvedení na trh nového léčiva tlumícího kašel bylo nutno provést stanovení benzokainu současně s dextromethorfanem a cetylpyridiniem. Jako optimální mobilní fáze byla zvolena voda : chloroform : methanol v poměru 10:50:40 s přidavkem ionově párového činidla. Byly použity kolony Nucleosil C<sub>18</sub> (5  $\mu\text{m}$ ) a Ultrabase C<sub>18</sub> (5  $\mu\text{m}$ ). Zkoumán byl vliv na výsledky stanovení při použití dvou různých typů detektorů - běžného spektrofotometrického (při  $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) a spektrofotometrického s diodovým polem, kdy mohla být každá z látek sledována při své optimální vlnové délce (pro benzokain zde zvolena  $\lambda = 278 \text{ nm}$ ). Bylo zjištěno, že při využití spektrofotometru s diodovým polem se zvýší citlivost a přesnost stanovení, nejnižší dosažená mez detekce benzokainu byla 3,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a  $s_r < 2,84 \%$ , zatímco u stanovení s běžným spektrofotometrem byla  $s_r > 4,1 \%$ .<sup>4</sup>

Aby mohl být benzokain legálně používán v USA k lokální anestezii ryb, bylo prováděno stanovení benzokainu a jeho metabolitu *N*-acetylbenzokainu ve tkáních pstruha s UV detekcí (při 289 nm pro benzokain). Tkáně byly nejprve extrahovány acetonitrilem a hexanem a poté byly vzorky ještě přečištěny extrakcí tuhou fází. Mobilní fází tvořila směs methanolu a vody v poměru 55:45 (v/v). Použitou kolonou byla kolona ODS (5 μm)-A. Získaná mez detekce byla 6 ng.g<sup>-1</sup> (6 ng v 1 g tkáně) a mez stanovitelnosti 22 ng.g<sup>-1</sup> (22 ng v 1 g tkáně).<sup>5</sup>

### 1.3.2.2 Analýza metodou HPLC s ED a UV detekcí

Analýza bazických léčiv a příbuzných látek byla provedena s amperometrickou a fotometrickou detekcí (při 254 nm). Stacionární fází byl silikagel a mobilní fází tvořil methanol spolu s 1.10<sup>-2</sup> mol.l<sup>-1</sup> chloristanem draselným (pH 6,7). Amperometrický detektor sestával z pracovní elektrody ze skelného uhlíku a z referentní argentchloridové elektrody. Na pracovní elektrodu bylo vloženo napětí +1,2 V. Pro benzokain byl stanoven retenční faktor  $k = 0,1$  a poměr odezev detektorů byl roven 43. Tento poměr byl udán jako poměr výšky amperometrického píku při +1,2 V (v μA) a výšky fotometrického píku při 254 nm (v jednotkách absorbance).<sup>6,7</sup>

### 1.3.3 Ostatní metody stanovení benzokainu

Nejnižších detekčních mezí bylo dosaženo při diferenční pulsní adsorptivní rozpouštěcí voltametii. Benzokain byl stanovován současně s butakainem. V rámci tohoto stanovení byl zkoumán vliv modifikace elektrody na výsledky stanovení benzokainu. Pracovní elektrodou byla v prvním případě elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná nafionem a v druhém případě byla použita nemodifikovaná elektroda ze skelného uhlíku. V případě modifikované elektrody byla zjištěna linearita odezvy v koncentračním rozmezí 3,2.10<sup>-9</sup> mol.l<sup>-1</sup> až 4,5.10<sup>-7</sup> mol.l<sup>-1</sup> a bylo dosaženo vůbec nejnižší detekční meze 2,4.10<sup>-9</sup> mol.l<sup>-1</sup> a meze stanovení 7,97.10<sup>-9</sup> mol.l<sup>-1</sup>, zatímco u nemodifikované elektrody byla linearita potvrzena pouze v koncentračním rozmezí 2.10<sup>-8</sup> mol.l<sup>-1</sup> až 6,4.10<sup>-7</sup> mol.l<sup>-1</sup>

a bylo dosaženo meze detekce  $1,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$  a meze stanovení  $3,9 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$ . Při použití nafionem modifikované elektrody došlo tedy ke zvýšení citlivosti stanovení. Tato metoda byla poté úspěšně využita pro stanovení benzokainu a butakainu ve vzorcích lidské moči.<sup>8</sup>

Další zajímavou metodou stanovení benzokainu společně s prokainem a tetrakainem je sekvenční průtoková analýza s chemiluminiscenční detekcí, jež byla vyvinuta na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Chemiluminiscence analytů byla vyvolána oxidací manganistanem draselným ve vodném prostředí kyseliny sírové s přidavkem látek zesilujících chemiluminiscenci (4-hydroxybifenyly, rhodamin apod.). Linearita odezvy kalibračních roztoků byla měřena v rozmezí  $0,5 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$  až  $25 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$  a byla potvrzena v celém intervalu. Mez detekce benzokainu získaná touto metodou byla  $0,3 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ . Touto metodou byl poté úspěšně stanoven obsah daných látek v léčivech.<sup>9</sup>

Nízké meze detekce  $0,04 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$  bylo dosaženo při stanovení benzokainu v léčivech průtokovou injekční analýzou s následnou spektrofotometrickou detekcí, založenou na derivatizaci primární aminové skupiny studované látky, jež vede k vytvoření intenzivně zbarveného produktu.<sup>10</sup>

Mezi další užívané metody patří kolorimetrické stanovení s užitím *p*-benzochinonu<sup>11</sup>, plynová chromatografie<sup>12</sup> či coulometrické stanovení.<sup>13</sup>

## 1.4 Uhlíková pastová elektroda

Uhlíkové pastové elektrody (Carbon Paste Electrodes, CPEs) byly poprvé představeny R. N. Adamsem v roce 1958.<sup>14</sup> Snahou R. N. Adamse bylo nalézt elektrodu se snadno obnovitelným povrchem, jež by byla využitelná pro anodické oxidace. Sloužila by tak pro měření v oblasti pozitivnějších potenciálů, kde není možné využít rtuťovou kapkovou elektrodu, jelikož u ní v této oblasti dochází k anodické oxidaci rtuti. Měla se jí stát tzv. „kapající uhlíková elektroda“, jakási disperze práškového uhlíku v organické kapalině, realizovaná pomocí kapiláry. Takováto kapající uhlíková elektroda se neosvědčila, ale ukázalo se, že hustší směs práškovitého uhlíku s organickou kapalinou (uhlíková pasta) je vhodným materiálem pro konstrukci elektrod se zajímavými vlastnostmi.

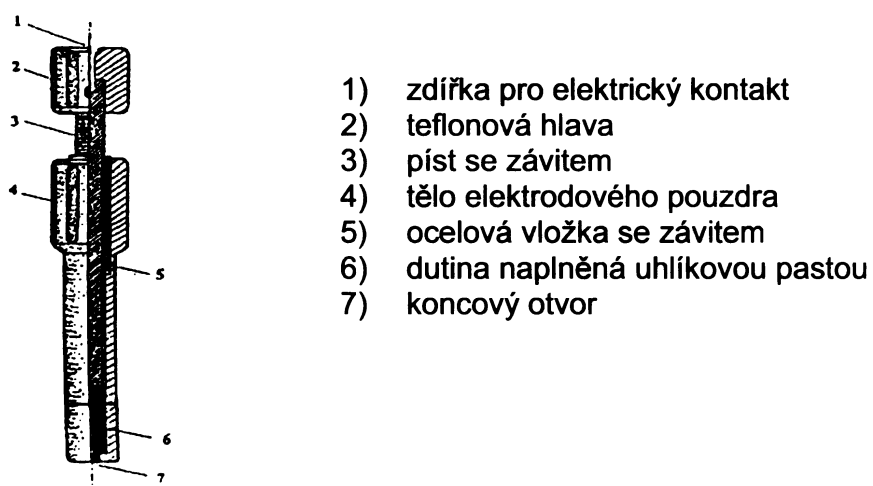
CPEs lze zařadit mezi heterogenní uhlíkové elektrody s kapalným pojivem (pastovací kapalinou). Pastovací kapalinou bývá nejčastěji chemicky inertní, elektrochemicky inaktivní a málo těkává látka, například silikonový či parafinový olej (Nujol). Pastovací kapalina však přesto výrazně ovlivňuje elektrochemické vlastnosti uhlíkové pasty.<sup>15</sup> Uhlíková pasta může být také velmi jednoduše modifikována různými látkami.<sup>16</sup>

Uhlíková pasta se připravuje důkladným smíšením uhlíkového (grafitového) prášku s vhodnou pastovací kapalinou. Často používaným poměrem bývá jeden gram uhlíkového prášku a 0,4 ml pastovací kapaliny. Připravenou pastou se plní elektrodové pouzdro (Obr. 1.1). Chování řady připravených past se většinou ustálí až po určité době (přibližně 24 hodin), pravděpodobně v důsledku následné samovolné homogenizace u čerstvě připravené směsi. Proto je dobré nechat elektrody naplněné čerstvě připravenou pastou v klidu „vyzrát“ nejméně přes noc. Není vhodné ponechávat naplněnou elektrodu dlouhou dobu na vzduchu, poněvadž pasta pozvolna vysychá. Proto se uchovává ponořena koncovým otvorem do nádobky s destilovanou vodou.

Uhlíkové pasty mají ve většině užívaných elektrolytů potenciálový rozsah srovnatelný s ostatními pevnými elektrodami (přibližně -1,5 V až +1,0 V vs SCE v závislosti na pH prostředí). Nevýhodou CPEs je, že vykazují nezanedbatelný proud, jenž je zapříčiněn elektrodovou redukcí rozpuštěného kyslíku v pastě. Tento rušivý signál komplikuje měření v oblasti katodických potenciálů. Naopak velkou výhodou při měření

s CPEs jsou velmi nízké hodnoty zbytkových proudů, na kterých se podílí především přítomnost pastovací kapaliny.<sup>15</sup>

CPEs mají velmi širokou oblast použití. Uplatňují se jak v oblasti anorganické elektroanalýzy (například při stanovení stopových množství kovů v různých iontových formách), tak v oblasti elektroanalýzy organické. Zde mají největší využití ve voltametrických a dále pak v amperometrických metodách. Kromě praktických aplikací můžou být CPEs využívány i při studiu reakčních mechanismů či elektrochemického chování organických látek. CPEs se rovněž uplatňují při konstrukcích elektrochemických detektorů na bázi uhlíkové pasty, jež slouží při analýzách složitých směsí organických látek. V současné době dominuje využití CPEs v analytických aplikacích pro sledování kvality životního prostředí a při kontrole léčiv.<sup>17</sup>



**Obr. 1.1** Pouzdro pro uhlíkovou pastovou elektrodu.<sup>15</sup>

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Použité chemikálie

Studovaná látka: Benzokain, čistota  $\geq 98\%$  (Sigma)

Zásobní roztok o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v methanolu (p.a., Penta, Chrudim). Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku methanolem. Všechny roztoky byly uchovávány v temnu v chladničce při konstantní teplotě  $5\text{ }^\circ\text{C}$ .

Pro přípravu mobilních fází byl použit methanol (p.a., Penta, Chrudim).

K přípravě vodných roztoků a mobilních fází byla použita deionizovaná voda (Millipore Q-plus System, Millipore, USA).

Fosfátové tlumivé roztoky byly připraveny rozpuštěním přesně odváženého množství dihydrogenfosforečnanu sodného (p.a., Lachema Brno) a hydroxidu sodného (p.a., Lachema Brno) v deionizované vodě. K nastavení pH 2 a pH 4 tlumivých roztoků byla použita kyselina fosforečná (85%,  $\rho = 1,71 \text{ g.ml}^{-1}$ , p.a., Lachema Brno) a k nastavení pH 7 byl použit vodný roztok hydroxidu sodného (p.a., Lachema Brno) o koncentraci  $2 \cdot 10^{-1} \text{ mol.l}^{-1}$ . Přesná hodnota pH byla měřena pH metrem.

Mobilní fáze byla připravena smísením 80 objemových dílů methanolu s 20 objemovými díly vodné složky. pH mobilní fáze bylo upravováno pomocí fosfátového pufru změnou pH vodné složky mobilní fáze. V dalším textu uváděné hodnoty pH jsou tedy hodnoty pH vodné složky mobilní fáze před jejím smísením s methanolem.

Uhlíková pasta byla připravena smísením 250 mg mikrokuliček skelného uhlíku o průměru  $0,4 - 12 \text{ }\mu\text{m}$  (Alpha Aesar, USA) a  $90 \text{ }\mu\text{l}$  minerálního oleje (Fluka Biochemika, Švýcarsko).

## 2.2 Použitá aparatura

**Pumpa:** vysokotlaká pumpa HPP 5001 (Laboratorní přístroje, Praha)

**Kolona:** Lichrospher®RP-18, 100 (5 µm), 125 × 4 mm (LichroCART)

**Dávkovač:** LCI 30 se smyčkou 20 µl (Laboratorní přístroje, Praha), nástřik byl prováděn injekční stříkačkou

**Detektory:** *Spektrofotometrický UV/VIS detektor* LCD 2040

(Laboratorní přístroje, Praha)

*Amperometrický detektor* ADLC 2 (Laboratorní přístroje, Praha):

Tělo pracovní elektrody bylo teflonové, vytlačení pasty umožňoval nerezový píst. Aktivní plocha byla kruhová o průměru 3 mm. Referentní elektrodou byla argentchloridová elektroda s 3 mol.l<sup>-1</sup> KCl a jako pomocná elektroda sloužila elektroda platinová.

**Programové vybavení:** CSW 1.7 (Data Apex Ltd.), pracující v prostředí Windows 95 (Microsoft)

## 2.3 Ostatní používaná zařízení

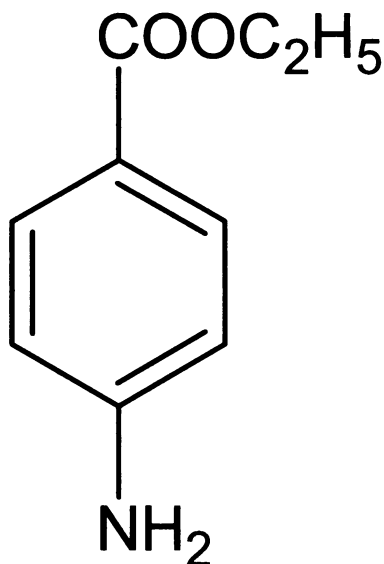
**pH metr:** digitální měřicí přístroj Conductivity and pH meter 4330 (Jenway, UK) s kombinovanou skleněnou elektrodou

**Spektrofotometr:** PU 8800 (Philips, UK), stanovení stálosti zásobního roztoku v křemenných kyvetách o tloušťce 1 mm

**Odstranění vzduchu:** ultrazvuková čistička PSO2000A (Powersonic, USA)

## 2.4 Studovaná látka

### Benzokain<sup>2,18</sup>



Systematický název: ethyl-4-aminobenzoát; ethylester-4-aminobenzoové kyseliny

Triviální název: benzokain, anesthesin

C.A.S. Registry number: [94-09-7]

$C_9H_{11}NO_2$

$M_r = 165,194$

$T_f = 89\text{ °C}$  až  $92\text{ °C}$

Vlastnosti: Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96 % a v etheru. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny  $C_9H_{11}NO_2$ .

Uchovávání: Chráněn před světlem.



## 2.5 Použité vzorce<sup>19</sup>

**Retenční faktor  $k$  :**

$$k = (t_R - t_M) / t_M$$

$t_R$  . . . retenční čas

$t_M$  . . . mrtvý čas

## 2.6 Pracovní postupy

### 2.6.1 Stálost zásobního roztoku benzokainu

Stálost zásobního roztoku byla sledována průběžným proměřováním zásobního roztoku benzokainu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  spektrofotometricky. Absorpční spektrum bylo měřeno v křemenných kyvetách proti methanolu v rozmezí vlnových délek 200-500 nm.

### 2.6.2 HPLC stanovení benzokainu

Měření bylo prováděno na netermostatované koloně Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 (5  $\mu\text{m}$ ),  $125 \times 4 \text{ mm}$ . Průtok mobilní fáze o daném složení byl  $0,5 \text{ ml.min}^{-1}$ . Dávkováno bylo vždy 20  $\mu\text{l}$  roztoku benzokainu v methanolu.

Kalibrační závislosti benzokainu byly proměřeny v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-4}$  až  $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ . Pro zpracování naměřených hodnot byla využita metoda lineární regrese. Ze získaných výsledků byly stanoveny meze detekce, a to jakožto množství analytu poskytující signál, jehož výška je rovna trojnásobku absolutní hodnoty šumu.

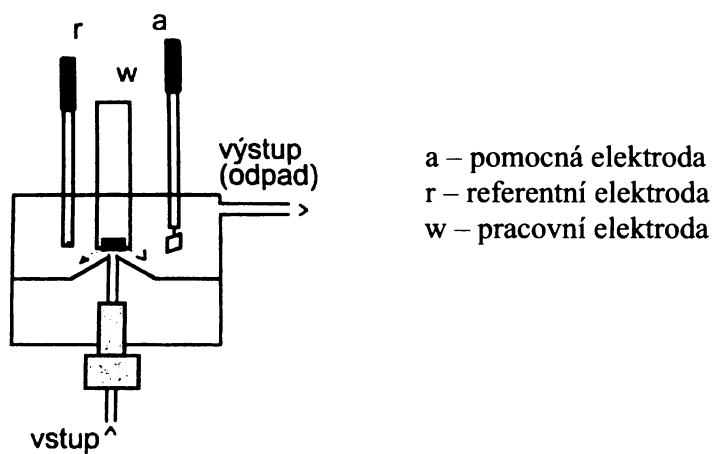
### 2.6.2.1 HPLC stanovení benzokainu s UV detekcí

UV detekce probíhala při 292 nm, což je absorpční maximum této látky. Stanovení mrtvého času bylo provedeno nástřikem vodného roztoku dusičnanu sodného o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  při vlnové délce 230 nm.

### 2.6.2.2 HPLC stanovení benzokainu s elektrochemickou detekcí

Elektrochemický detektor byl zapojen sériově za UV detektor. Jednalo se o detektor typu wall-jet (viz Obr. 2.1), jenž pracoval v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou byla uhlíková pastová elektroda, referentní elektrodou argentchloridová elektroda s  $3 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KCl}$  a pomocnou elektrodou pak byla elektroda platinová. Konec kapiláry byl přiveden k povrchu pracovní elektrody, která byla spolu s pomocnou a referentní elektrodou ponořena v mobilní fázi.

Hydrodynamické voltamogramy byly získány proměřením roztoku benzokainu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Měření bylo provedeno pro pH mobilní fáze 2, 4 a 7. Na pracovní elektrodu byl vložen potenciál v rozmezí +0,8 V až +1,4 V.



Obr. 2.1 Detektor typu wall jet.<sup>20</sup>

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

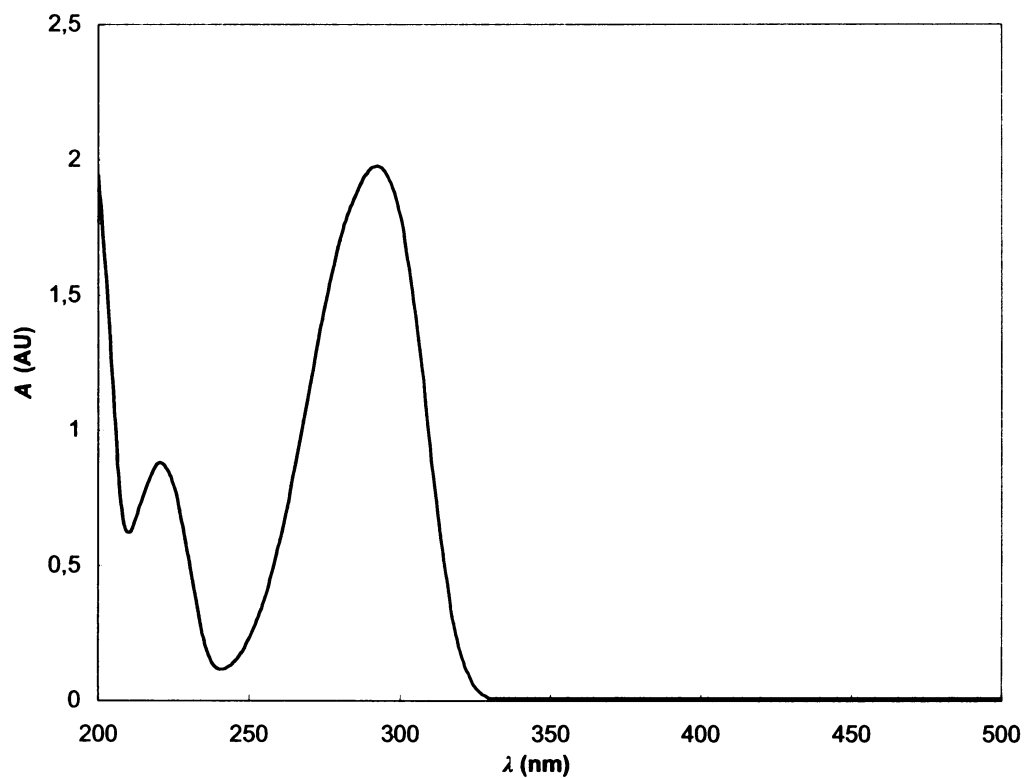
#### 3.1 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku benzokainu

Stálost zásobního roztoku benzokainu v methanolu byla sledována spektrofotometricky.

Byly sledovány absorbance při dvou vlnových délkách v průběhu 2 měsíců, naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 3.1. Z hodnot vyplývá, že zásobní roztok benzokainu v methanolu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  je při uchování v temnu v chladničce při teplotě  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  stálý nejméně 2 měsíce. Z absorpčního spektra (Obr. 3.1) vyplývá, že absorpční maximum studované látky je 292 nm.

**Tab. 3.1** Stálost zásobního roztoku benzokainu v methanolu o  $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  (sledováno spektrofotometricky).

$t$ (dny)	$\lambda = 221 \text{ nm}$		$\lambda = 292 \text{ nm}$	
	$A$ (AU)	%	$A$ (AU)	%
0	0,879	100,0	1,979	100,0
1	0,874	99,4	1,965	99,3
4	0,871	99,1	1,963	99,2
10	0,872	99,2	1,973	99,7
31	0,878	99,9	1,981	100,1
63	0,865	98,4	1,969	99,5



**Obr. 3.1** UV-VIS spektrum benzokainu o  $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  v methanolu (měřeno v křemenné kyvetě o tloušťce 1 mm proti methanolu).

## 3.2 HPLC stanovení s elektrochemickou a UV detekcí

### 3.2.1 Optimalizace podmínek

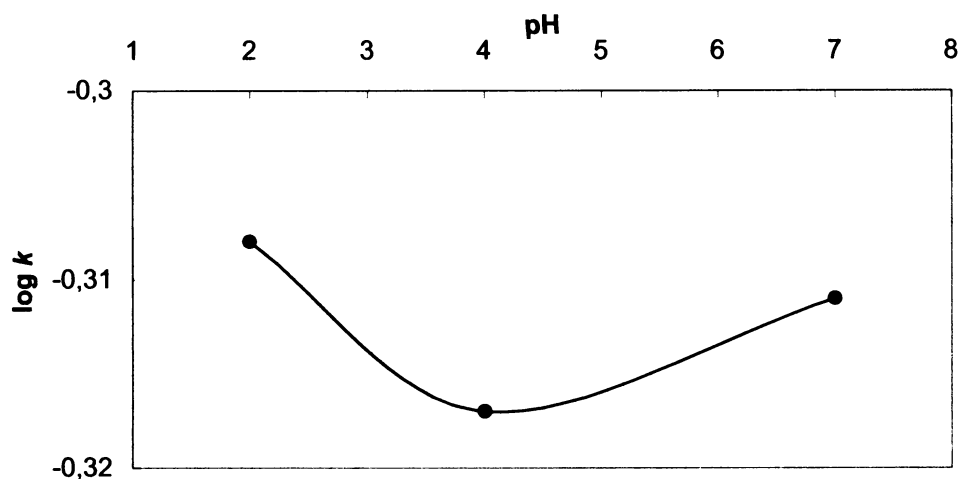
#### 3.2.1.1 Vliv pH mobilní fáze na retenční chování

Měření bylo provedeno při pH mobilní fáze 2, 4 a 7, volba pH byla omezena možnostmi kolony, která neumožňuje měření v zásadité oblasti. Průtoková rychlost byla  $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  a dávkováno bylo  $20 \mu\text{l}$  roztoku benzokainu v methanolu o koncentraci  $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . K detekci byl použit UV/VIS detektor při vlnové délce  $292 \text{ nm}$ . Mrtvý čas byl určen nadávkováním vodného roztoku  $\text{NaNO}_3$  o koncentraci  $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , detegováno při vlnové délce  $230 \text{ nm}$ .

Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 3.2. Z těchto výsledků je patrné, že pH mobilní fáze s vysokým obsahem organického modifikátoru příliš neovlivňuje chromatografické chování benzokainu. Na obrázku 3.2 je závislost dekadického logaritmu retenčního faktoru na pH zpracována graficky.

**Tab. 3.2** Vliv pH mobilní fáze na retenční chování benzokainu.

pH	2	4	7
$t_R$ (min)	2,686	2,667	2,68
$\log k$	-0,308	-0,317	-0,311



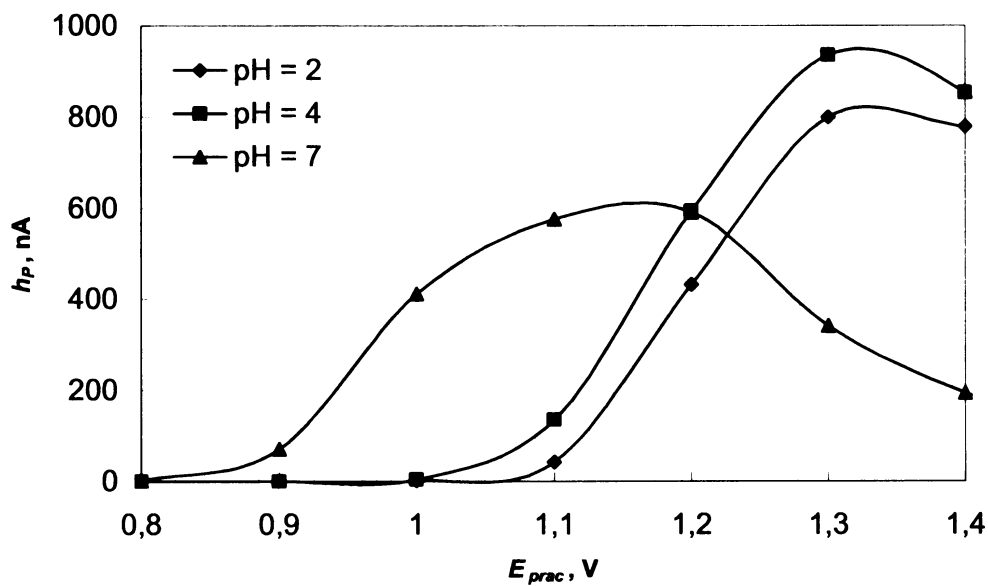
**Obr. 3.2** Závislost logaritmu retenčního faktoru benzokainu na pH mobilní fáze (kolona Lichrospher® RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr : methanol 20:80 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  v MeOH, UV detekce při 292 nm).

### 3.2.1.2 Hydrodynamické voltamogramy

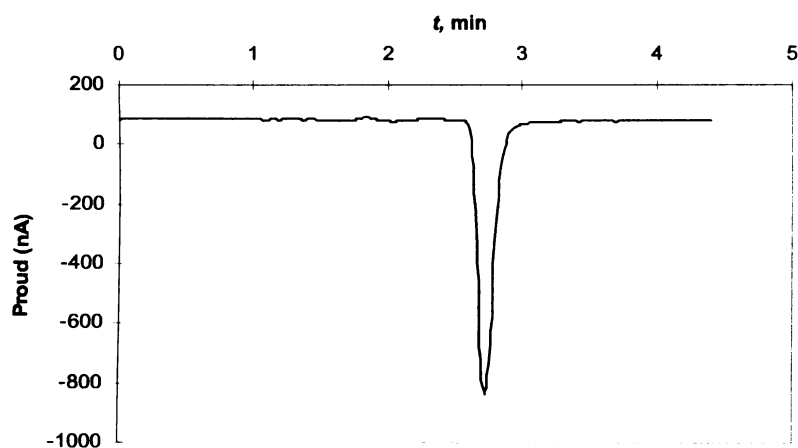
Velmi důležitým faktorem pro optimální stanovení látek je také nalezení optimálního potenciálu pracovní elektrody. K určení optimálního potenciálu byly změřeny hydrodynamické voltamogramy studované látky, tj. závislosti výšky píku na potenciálu vkládaném na pracovní elektrodu.

Měření bylo provedeno pro pH mobilní fáze 2, 4 a 7. Hodnoty potenciálů pracovní elektrody byly v rozmezí +0,8 V až +1,4 V.

Získané hydrodynamické voltamogramy jsou znázorněny na obrázku 3.3. Jako optimální podmínky stanovení benzokainu pro další měření byly zvoleny pH mobilní fáze 4 a potenciál pracovní elektrody +1,3 V. Na obrázku 3.4 je uveden chromatogram získaný právě při těchto podmínkách.



**Obr. 3.3** Hydrodynamické voltamogramy benzokainu vyhodnocené z výšek píků  $h_p$  (kolona Lichrospher® RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o uvedeném pH : methanol 20:80 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol.l $^{-1}$  v MeOH).



**Obr. 3.4** Chromatogram benzokainu. (Amperometrická detekce na CPE při potenciálu +1,3 V, kolona Lichrospher® RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 20:80 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol.l $^{-1}$  v MeOH).

### 3.2.2 Kalibrační závislosti

Proměření kalibračních závislostí benzokainu bylo provedeno za zjištěných optimálních podmínek, tj. pH mobilní fáze 4 a potenciálu pracovní elektrody +1,3 V. Měření probíhalo za podmínek uvedených v kapitole 2.6.2.

#### 3.2.2.1 Spektrofotometrická detekce

UV spektrofotometrická detekce probíhala při 292 nm. Proměřeny byly koncentrace v rozmezí  $1 \cdot 10^{-4}$  až  $2 \cdot 10^{-7}$  mol.l<sup>-1</sup>. Vyhodnoceny byly plochy i výšky píků. Kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. V tabulkách 3.3 a 3.4 jsou uvedeny získané parametry kalibračních závislostí. Na obrázcích 3.5 a 3.6 jsou zobrazeny kalibrační přímky v nejnižším koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup>. Obrázky 3.7 a 3.8 znázorňují kalibrační závislosti v celém koncentračním rozmezí v logaritmické formě.

Mez detekce  $L_D = 1,1 \cdot 10^{-7}$  mol.l<sup>-1</sup> byla stanovena jako množství analytu poskytující signál, jehož výška je rovna trojnásobku absolutní hodnoty šumu.

Kalibrační závislosti jsou lineární v celé měřené oblasti koncentrací, druhá mocnina korelačních koeficientů se pohybuje v intervalu 0,9993 až 0,9968. Směrnice logaritmických závislostí linearitu potvrzují, jelikož se jejich hodnota blíží jedné.

**Tab. 3.3** Parametry kalibračních závislostí benzokainu pro HPLC s UV spektrofotometrickou detekcí při 292 nm vyhodnocené z ploch píků.

koncentrační rozmezí (mol.l <sup>-1</sup> )	směrnice (AU.s.mol <sup>-1</sup> .l)	úsek (mAU.s)	$R^2$
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	116900	337,4	0,9978
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	130700	-29,3	0,9990
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	123000	0,3	0,9970
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	120800	59,4	0,9984

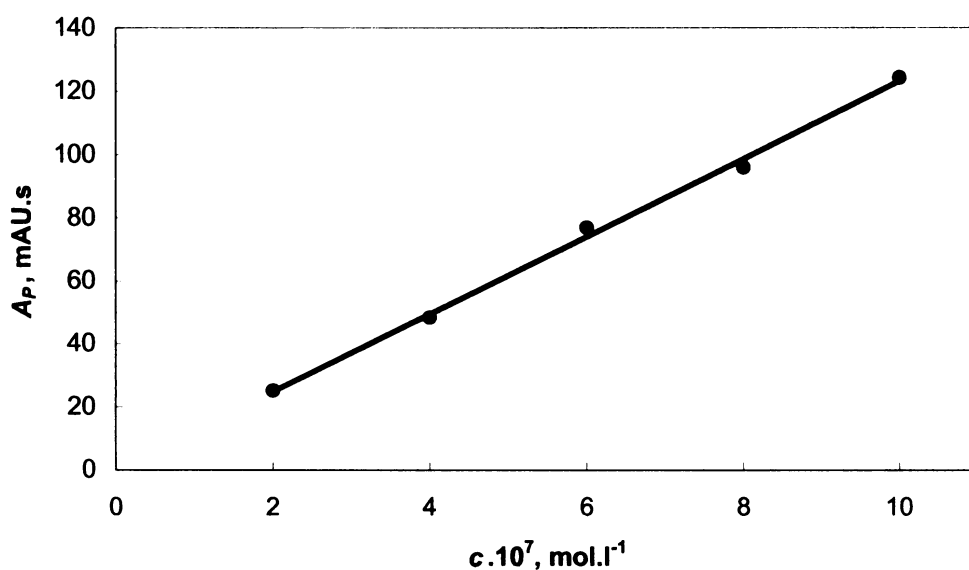
Závislost  $\log A_P$  na  $\log c$ : směrnice = 1,01; úsek = 8,1;  $R^2 = 0,9993$



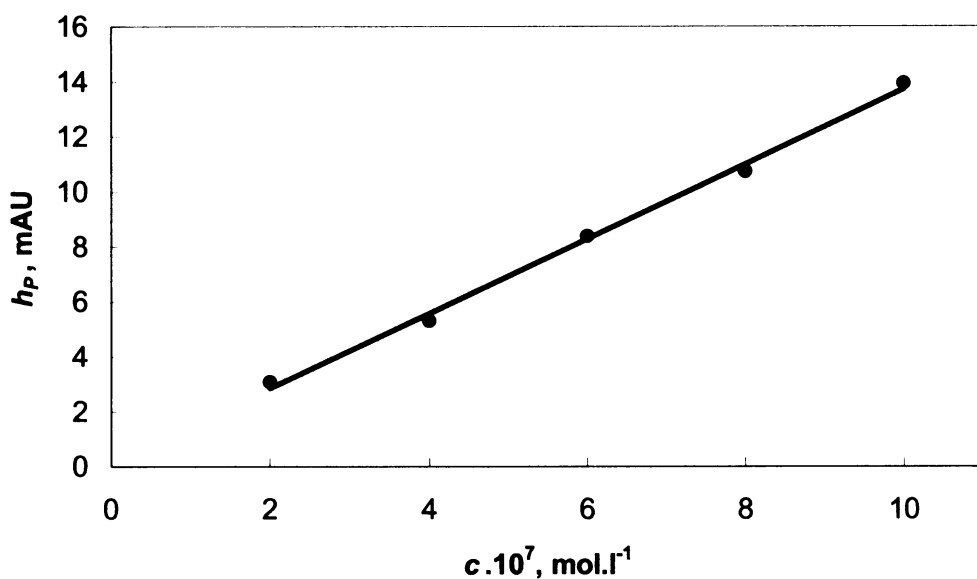
**Tab. 3.4** Parametry kalibračních závislostí benzokainu pro HPLC s UV spektrofotometrickou detekcí při 292 nm vyhodnocené z výšek píků.

koncentrační rozmezí (mol.l <sup>-1</sup> )	směrnice (AU.mol <sup>-1</sup> .l)	úsek (mAU)	R <sup>2</sup>
1.10 <sup>-5</sup> – 1.10 <sup>-4</sup>	12300	42,6	0,9980
1.10 <sup>-6</sup> – 1.10 <sup>-5</sup>	13900	-0,9	0,9989
2.10 <sup>-7</sup> – 1.10 <sup>-6</sup>	13600	0,1	0,9968
2.10 <sup>-7</sup> – 1.10 <sup>-4</sup>	12800	8,4	0,9983

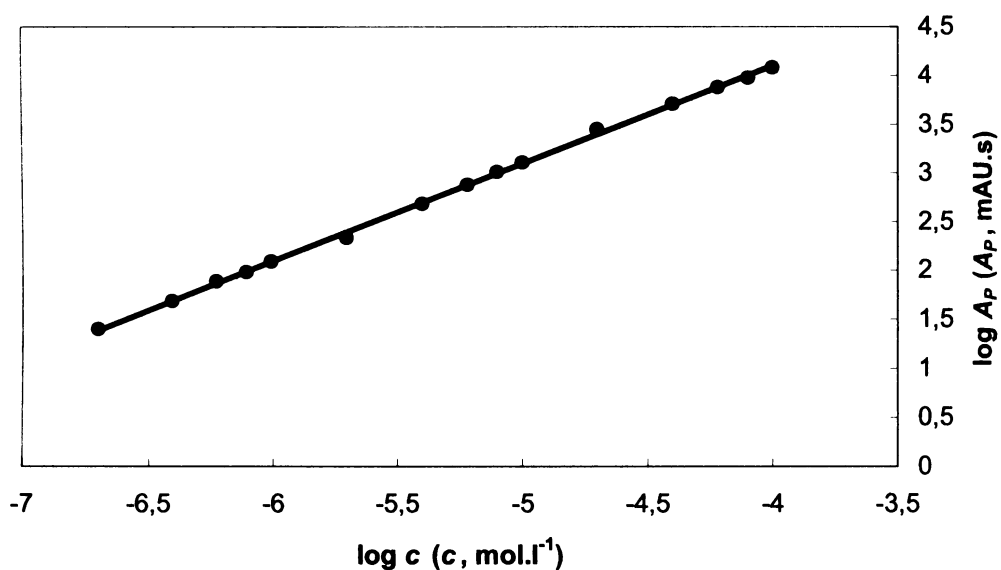
Závislost log  $h_P$  na log  $c$ : směrnice = 0,99; úsek = 7,1;  $R^2 = 0,9993$



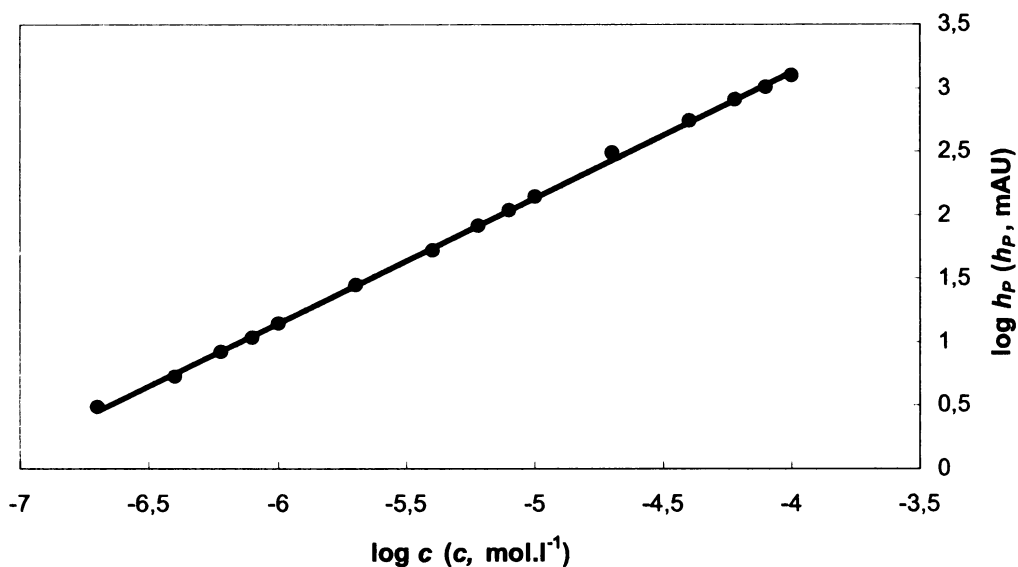
**Obr. 3.5** Kalibrační závislost benzokainu, vyhodnoceno z ploch píků  $A_P$  v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> (kolona Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 -5  $\mu$ m, 125  $\times$  4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 20:80 (v/v), dávkováno 20  $\mu$ l roztoku látky v MeOH, UV detekce při 292 nm).



**Obr. 3.6** Kalibrační závislost benzokainu, vyhodnoceno z výšek píků  $h_P$  v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (kolona Lichrospher® RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 20:80 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku látky v MeOH, UV detekce při 292 nm).



**Obr. 3.7** Kalibrační závislost benzokainu v logaritmické formě, vyhodnoceno z ploch píků  $A_P$  v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (kolona Lichrospher® RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 20:80 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku látky v MeOH, UV detekce při 292 nm).



**Obr. 3.8** Kalibrační závislost benzokainu v logaritmické formě, vyhodnoceno z výšek píků  $h_P$  v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> (kolona Lichrospher® RP-18, 100 -5 μm, 125 × 4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 20:80 (v/v), dávkováno 20 μl roztoku látky v MeOH, UV detekce při 292 nm).

### 3.2.2.2 Elektrochemická detekce

Kalibrační závislosti byly proměřeny s amperometrickou detekcí. Jako pracovní elektroda sloužila uhlíková pastová elektroda, na kterou byl vložen potenciál +1,3 V. Proměřovány byly koncentrace v rozmezí  $1 \cdot 10^{-4}$  až  $2 \cdot 10^{-7}$  mol.l<sup>-1</sup>.

Vyhodnoceny byly plochy i výšky píků. Závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Získané parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v tabulkách 3.5 a 3.6.

Na obrázcích 3.9 a 3.10 jsou zobrazeny kalibrační přímky v nejnižším koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup>. Obrázky 3.11 a 3.12 znázorňují kalibrační závislosti v celém koncentračním rozmezí v logaritmické formě.

Mez detekce  $L_D = 2 \cdot 10^{-7}$  mol.l<sup>-1</sup> byla stanovena jako množství analytu poskytující signál, jehož výška je rovna trojnásobku absolutní hodnoty šumu.

Kalibrační závislosti jsou lineární v celé měřené oblasti koncentrací, druhá mocnina korelačních koeficientů se pohybuje v intervalu 0,9995 až 0,9963. Směrnice logaritmických závislostí linearitu potvrzují, jelikož se jejich hodnota blíží jedné. Mez detekce je přibližně stejná jako u stanovení se spektrofotometrickou detekcí.

**Tab. 3.5** Parametry kalibračních závislostí benzokainu pro HPLC s amperometrickou detekcí na CPE při potenciálu +1,3 V vyhodnocené z ploch píků.

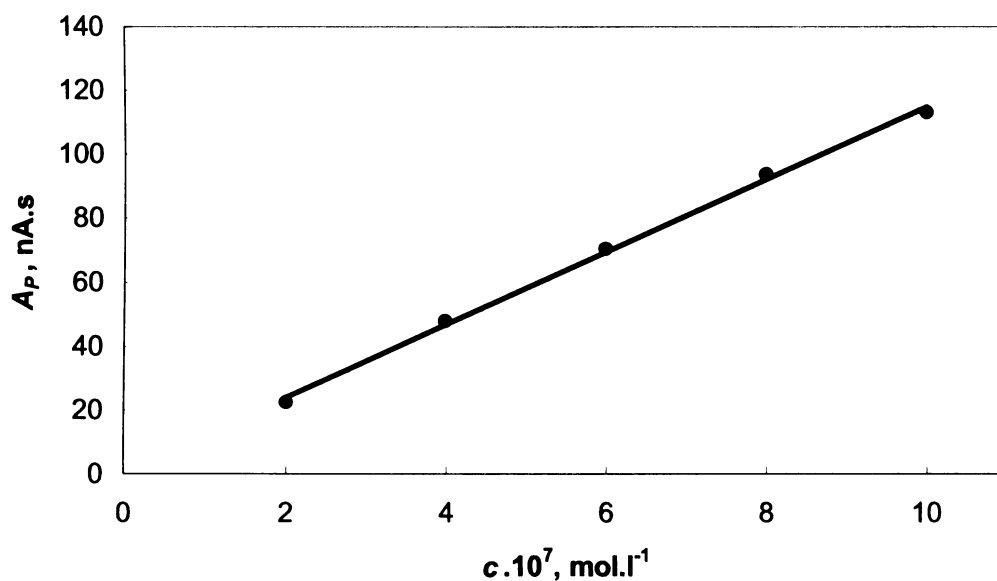
koncentrační rozmezí (mol.l <sup>-1</sup> )	směrnice (mA.s.mol <sup>-1</sup> .l)	úsek (nA.s)	R <sup>2</sup>
1.10 <sup>-5</sup> – 1.10 <sup>-4</sup>	117,1	298,4	0,9988
1.10 <sup>-6</sup> – 1.10 <sup>-5</sup>	134,0	-35,1	0,9995
2.10 <sup>-7</sup> – 1.10 <sup>-6</sup>	113,5	1,4	0,9980
2.10 <sup>-7</sup> – 1.10 <sup>-4</sup>	120,5	56,7	0,9989

Závislost log A<sub>P</sub> na log c: směrnice = 1,01; úsek = 8,2; R<sup>2</sup> = 0,9994

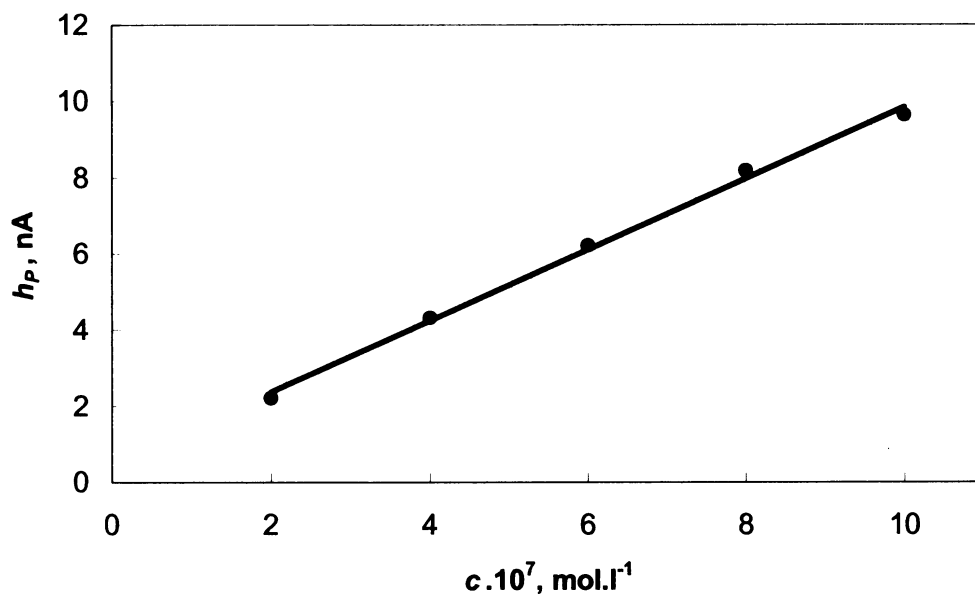
**Tab. 3.6** Parametry kalibračních závislostí benzokainu pro HPLC s amperometrickou detekcí na CPE při potenciálu +1,3 V vyhodnocené z výšek píků.

koncentrační rozmezí (mol.l <sup>-1</sup> )	směrnice (mA.mol <sup>-1</sup> .l)	úsek (nA)	R <sup>2</sup>
1.10 <sup>-5</sup> – 1.10 <sup>-4</sup>	9,1	29,0	0,9977
1.10 <sup>-6</sup> – 1.10 <sup>-5</sup>	10,1	-1,0	0,9990
2.10 <sup>-7</sup> – 1.10 <sup>-6</sup>	9,3	0,5	0,9963
2.10 <sup>-7</sup> – 1.10 <sup>-4</sup>	9,5	5,4	0,9983

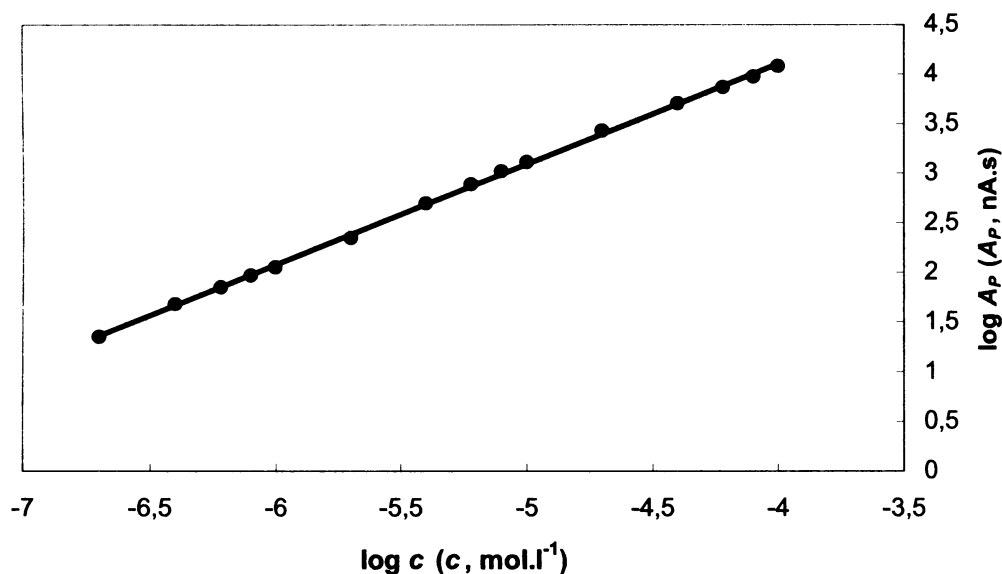
Závislost log h<sub>P</sub> na log c: směrnice = 0,99; úsek = 6,9; R<sup>2</sup> = 0,9995



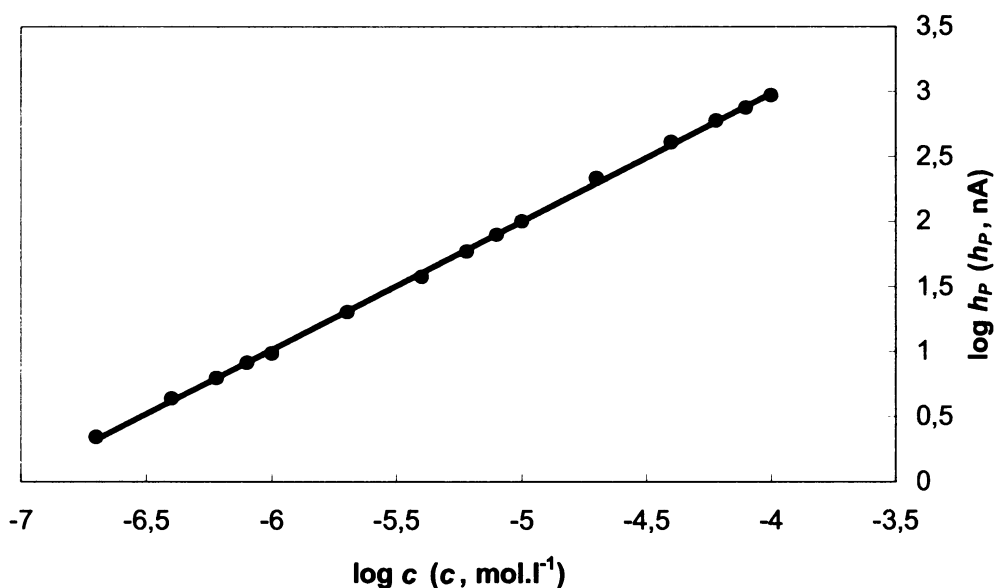
**Obr. 3.9** Kalibrační závislost benzokainu, vyhodnoceno z ploch píků A<sub>P</sub> v koncentračním rozmezí 2.10<sup>-7</sup> až 1.10<sup>-6</sup> mol.l<sup>-1</sup> (kolona Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 -5 μm, 125 × 4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4:methanol 20:80 (v/v), dávkováno 20 μl roztoku látky v MeOH, amperometrická detekce na CPE při potenciálu +1,3 V).



**Obr. 3.10** Kalibrační závislost benzokainu, vyhodnoceno z výšek píků  $h_P$  v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (kolona Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 20:80 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku látky v MeOH, amperometrická detekce na CPE při potenciálu +1,3 V).



**Obr. 3.11** Kalibrační závislost benzokainu v logaritmické formě, vyhodnoceno z ploch píků  $A_P$  v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (kolona Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 20:80 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku látky v MeOH, amperometrická detekce na CPE při potenciálu +1,3 V).



**Obr. 3.12** Kalibrační závislost benzokainu v logaritmické formě, vyhodnoceno z výšek píků  $h_P$  v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (kolona Lichrospher® RP-18,  $100 - 5 \mu\text{m}$ ,  $125 \times 4 \text{ mm}$ , mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 20:80 (v/v), dávkováno  $20 \mu\text{l}$  roztoku látky v MeOH, amperometrická detekce na CPE při potenciálu +1,3 V).

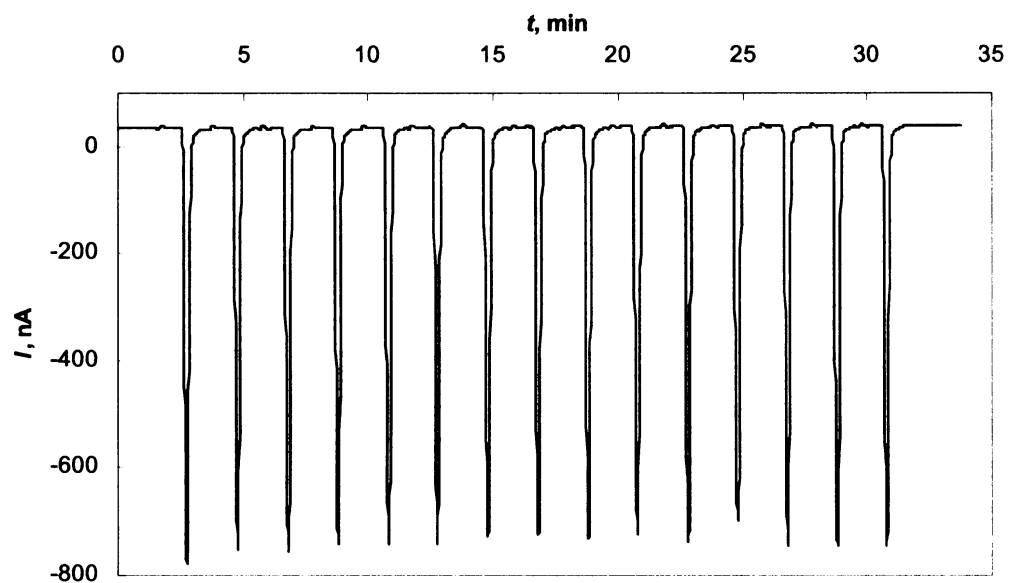
### 3.2.3 Opakovatelnost měření elektrochemické detekce

Opakovatelnost měření elektrochemické detekce s uhlíkovou pastovou elektrodou byla zjištěna patnáctinásobným nadávkováním  $20 \mu\text{l}$  roztoku benzokainu o koncentraci  $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  v methanolu. Dávkování probíhalo v intervalech 2 minuty. Při měření byly použity optimální podmínky.

Výsledky jsou zaznamenány v tabulce 3.7 a záznam chromatogramu na obrázku 3.13. Stanovené relativní směrodatné odchylky jsou 1,5 % pro plochu píku a 2,3 % pro výšku píku.

**Tab. 3.7** Opakovatelnost měření elektrochemické detekce pro benzokain na CPE při potenciálu +1,3 V (kolona Lichrospher® RP-18, 100 -5 μm, 125 × 4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 20:80 (v/v), dávkováno 20 μl roztoku benzokainu o koncentraci 8.10<sup>-5</sup> mol.l<sup>-1</sup> v MeOH).

pík	$A_P$ (nA.s)	$h_P$ (nA)
1	9614	816
2	9527	794
3	9475	795
4	9468	783
5	9387	785
6	9496	784
7	9538	767
8	9544	767
9	9637	778
10	9431	765
11	9491	781
12	9029	741
13	9335	786
14	9308	749
15	9430	788
Průměr:	9447 nA.s	779 nA
s	142 nA.s	18 nA
$s_r$	1,5 %	2,3 %



**Obr. 3.13** Chromatogram zjištění opakovatelnosti elektrochemické detekce benzokainu na CPE při potenciálu +1,3 V (kolona Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125  $\times$  4 mm, mobilní fáze fosfátový pufr o pH 4 : methanol 20:80 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku benzokainu o koncentraci  $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  v MeOH).



## 4 ZÁVĚR

Bylo prostudováno chromatografické chování benzokainu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích s UV spektrofotometrickou a amperometrickou detekcí za použití uhlíkové pastové elektrody.

Byl proměřen vliv pH mobilní fáze na retenční chování studované látky s využitím spektrofotometrické detekce při vlnové délce 292 nm, jež odpovídá absorpčnímu maximu benzokainu. Z výsledků vyplynulo, že pH mobilní fáze nemá za studovaných podmínek na retenční chování téměř žádný vliv.

Byla prostudována závislost odezvy amperometrického detektoru s uhlíkovou pastovou elektrodou na vloženém potenciálu a pH mobilní fáze. Byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení studované látky na uhlíkové pastové elektrodě: potenciál vkládaný na pracovní elektrodu +1,3 V a mobilní fáze tvořená fosfátovým pufrem o pH 4 : methanol 20:80 (v/v). Spektrofotometrická detekce probíhala při 292 nm.

Za optimálních podmínek byly změřeny kalibrační závislosti studované látky a stanoveny meze detekce. Mez detekce získaná UV spektrofotometrickou detekcí byla  $1,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$  a mez detekce určená pomocí elektrochemické detekce byla  $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ . Meze detekce s UV spektrofotometrickou detekcí a amperometrickou detekcí jsou tedy přibližně stejné.

Byla zjištěna opakovatelnost měření elektrochemické detekce za optimálních podmínek, stanovené relativní směrodatné odchylky jsou 1,5 % pro plochu píku a 2,3 % pro výšku píku.

## LITERATURA

1. Hampl, F.; Paleček, J.: *Farmakochemie*. VŠCHT, Praha (2002).
2. *Český lékopis 2002 . 2. díl-Léčivé a pomocné látky*. Grada Publishing, Praha (2003)
3. Joseph-Charles, J.; Montagut, M.; Langlois, M.-H.; Boyer, C.; Dubost, J.-P.: Simultaneous determination of rutin and benzocaine in suppositories by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical Letters* **34**, 2685-2692 (2001).
4. Linares, P.; Gutiérrez, M.C.; Lázaro, F.; Luque de Astro, M.D.; Valcárcel, M.: Determination of benzocaine, dextromethorphan and cetylpyridinium ion by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography* **558**, 147-153 (1991).
5. Meinertz, J.R.; Stehly, G.R.; Hubert, T.D.; Bernardy, J.A.: Liquid chromatographic determination of benzocaine and N-acetylbenzocaine in the edible fillet tissue from rainbow trout. *Journal of Chromatography A* **855**, 255-260 (1999).
6. Štulík, K.; Pacáková, V.: *Elektroanalytická měření v proudících kapalinách*. SNTL, Praha (1989).
7. Jane, I.; McKinnon, A.; Flanagan, R.J.: High-performance liquid chromatographic analysis of basic drugs on silica columns using non-aqueous ionic eluents. *Journal of Chromatography* **323**, 191-225 (1985).
8. Reddy, T.M.; Balaji, K.; Reddy, S.; Reddy, J.: Differential pulse adsorptive stripping voltammetric determination of benzocaine and butacaine with nafion modified glassy carbon electrode. *Croatica Chemica Acta* **79**, 253-259 (2006).
9. Polášek, M.; Paseková, H.: Determination of procaine, benzocaine and tetracaine by sequential injection analysis with permanganate-induced chemiluminescence detection. *Talanta* **52**, 67-75 (2000).
10. Evgen'ev, M.I.; Garmonov, S.Yu.; Shakirova; Degterev, E.V.: Flow injection determination of drugs containing primary amine groups. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **36**, 559-564 (2002).
11. Amin, A.S.; El-Didamony, A.M.: Colorimetric determination of benzocaine, lignocaine and procaine hydrochlorides in pure form and in pharmaceutical formulations using p-benzoquinone. *Analytical Science* **19**, 1457-1459 (2003).

12. Biemer, T.A.; Asral, N.; Albanese, J.A.: Simultaneous, stability-indicating capillary gas chromatographic assay for benzocaine and the two principal benzyl esters of Balsam Peru formulated in a topical ointment . *Journal of Chromatography* **623**, 395-398 (1992).
13. Abdullin, I.F.; Chernysheva, N.N.; Budnikov, G.K.: Galvanostatic coulometric determination of aromatic amine derivatives in pharmaceutical preparations using electrochemically generated bromine. *Journal of Analytical Chemistry* **57**, 629-631 (2002).
14. Švancara, I.; Vytřas, K.; Barek, J.; Zima, J.: Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **31**, 311-345 (2001).
15. Švancara, I.; Vytřas, K.: Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod. *Chemické Listy* **88**, 138-146 (1994).
16. Švancara, I.; Ogorevc, B.; Hočevar, S.B.; Vytřas, K.: Perspectives of carbon paste electrodes in stripping potentiometry. *Analytical Science* **18**, 301-305 (2002).
17. Vytřas, K.; Švancara, I.: Aplikace uhlíkových pastových elektrod v elektroanalýze. *Chemické Listy* **88**, 412-422 (1994).
18. [www.eurochem.cz](http://www.eurochem.cz), staženo 16.5.2007.
19. Štulík, K. a kol.: *Analytické separační metody*. Karolinum, Praha (2004).
20. Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. Karolinum, Praha (2003).