

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie



Mikuláš Zich

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ SULFATHIAZOLU NA
BOREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ ELEKTRODĚ

VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF SULFATHIAZOLE ON
BORON DOPED DIAMOND ELECTRODE

Bakalářská práce

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

Praha 2023

Prohlášení

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

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

V Praze dne 16. července 2023

Poděkování

Z celého srdce děkuji svému vedoucímu práce prof. RNDr. Janu Fischerovi, Ph.D za ochotu, trpělivost, vstřícnost, cenné rady a odborné vedení mé bakalářské práce.

Dále bych rád poděkoval svým blízkým, kteří mě ve studiu podporovali a motivovali a členům laboratoře, kteří vždy ochotně poradili.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá studiem elektrochemicky aktivní látky sulfathiazolu. Sulfathiazol je látka s antibakteriálními účinky, která se přidává do potravy zvířatům. To vede k zamořování půdy, vody a potravin. Pro voltametrické stanovení byla jako pracovní elektroda vybrána borem dopovaná diamantová elektroda.

Nejprve bylo stanoveno optimální pH pro studium sulfathiazolu technikou diferenciální pulsní voltametrie v rozsahu 2 až 12 a optimální předúprava elektrody před měřením. Následně byla proměřena kalibrační závislost.

Sulfathiazol se podařilo rozpustit ve vodě při koncentrací $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a jako elektrolyt byl použit Britton-Robinsonův pufr. Optimální pH pro měření bylo určeno pH 6,0. Při tomto pH bylo dosaženo relativní směrodatné odchylky $s_r = 5\%$. Této směrodatné odchylky bylo dosaženo, když byla pracovní elektroda leštěna před každým měřením. Za těchto podmínek byla provedena kalibrační měření v koncentračním rozsahu 0,1 – 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Pro měření bylo dosaženo lineárního dynamického rozsahu v rozmezí: 0,1 – 20 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Mez stanovitelnosti byla určena jako 97 nmol l^{-1} .

Klíčová slova

Voltametrie

Diferenciální pulsní voltametrie

Borem dopovaná diamantová elektroda

Sulfonamidy

Sulfathiazol

Abstract

This bachelor thesis is dedicated to study of the electrochemically active substance sulfathiazole. Sulfathiazole is an antibacterial agent added to animal feed. As a result, it contaminates soil, water bodies and food. A boron-doped diamond electrode was chosen as the working electrode for voltammetric determination.

First, the optimal pH for the study of sulfathiazole in the range of 2 to 12 by the technique differential pulse voltammetry was determined and the optimal pretreatment of the electrode before measurements. Subsequently, the calibration dependence was measured.

Sulfathiazole was successfully dissolved in water at a concentration of $c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹ and Britton-Robinson buffer was used as the electrolyte. As the optimal pH was determined pH 6,0. At this pH, a relative standard deviation of $s_r = 5\%$ was achieved. Standard deviation of 5 % has been achieved when the working electrode was polished before each measurement. Under these conditions, was calibration dependence measured in concentration range from 0,1 to 100 μmol l⁻¹. Linear dynamic range was calculated between 0,1 – 20 μmol l⁻¹. Limit of quantitation was found to be 97 nmol l⁻¹.

Key words

Voltammetry

Differential pulse voltammetry

Boron doped diamond electrode

Sulfonamides

Sulfathiazole

Seznam použitých zkratek

BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda
BR pufr	Britton-Robinsonův pufr
c	koncentrace
CPE	elektroda z uhlíkové pasty
DPV	diferenciální pulsní voltametrie
E_p	elektrodový potenciál píku
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
I_p	proud píku
L_D	limit detekce
L_Q	mez stavitelnosti
SA	sulfonamidy
STZ	sulfathiazol

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Sulfonamidy.....	9
2.2	Studovaná látka.....	11
2.3	Borem dopovaná diamantová elektroda	15
2.4	Metody stanovení	16
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	17
3.1	Reagencie.....	17
3.2	Aparatura	17
3.3	Pracovní postup	18
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	19
4.1	Optimalizace pH.....	19
4.2	Opakovatelnost	25
4.3	Kalibrační závislost	28
5	ZÁVĚR	33
6	Bibliografie	34

1 ÚVOD

Sulfathiazol patří mezi sulfonamidy používané ve veterinářství. Přidávání sulfonamidů do potravy průmyslově chovaných zvířat vedlo ke zvýšení jejich zastoupení v půdě, vodě a potravinách. Na sulfonamidy se začalo pohlížet jako na environmentální znečišťovatele a vzrostla potřeba k nalezení analytické metody pro jejich stanovení. Z toho důvodu si tato bakalářská práce klade za cíl vývoj voltametrické metody, která bude rychle a efektivně schopná stanovit sulfathiazol.

Prvním úkolem této práce bylo určení optimálních podmínek, při kterých bude dosaženo nejlepších výsledků technikou diferenciální pulsní voltametrie ve vodním prostředí Britton-Robinsonova pufru na pracovní borem dopované diamantové elektrodě. Mezi optimální podmínky patří určení optimálního pH a adekvátní předúpravy pracovní elektrody.

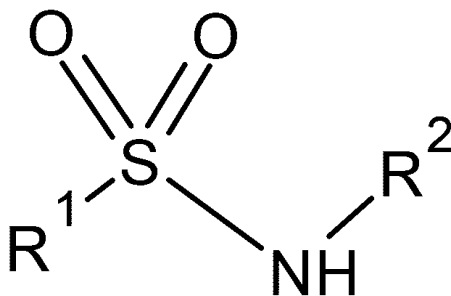
Druhým cílem je proměření kalibrační závislosti a dosažení co nejnižší meze stanovitelnosti a určení lineárního dynamického rozsahu.

Vývoj této metody bude přínosný z pohledu širšího zamření týmu laboratoře, protože optimalizovaná a plně funkční metoda může sloužit po snadné sledování koncentrací sulfathiazolu při jeho elektrochemické degradaci, která je řešena v dalším projektu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Sulfonamidy

Sulfonamidy (SA) jsou charakteristické svou sulfonamidovou skupinou. Ta obsahuje aminovou skupinu (R-NH₂) spojenou se sulfonylovou skupinou (R,R'-SO₂). Obecný strukturní vzorec sulfonamidů je zobrazen na Obr. 1.



Obr. 1: Obecný strukturní vzorec sulfonamidů.

Sulfonamidy (SA) projevují antibakteriální účinky. Těch si jako první povšiml G. Domagk po chemoterapeutickém účinku prontosilu na streptokokovou infekci^{1,2}. Zpočátku se zdálo, že SA specificky napadají pouze streptokoky, nicméně podrobným zkoumáním chemoterapeutických účinků SA a experimentech s řadou derivátů bylo objeveno, že SA mají efekt na široké spektrum bakteriálních infekcí a to jak na bakterie gram pozitivní, tak gram negativní. SA prokázali dobré antibakteriální schopnosti in vitro i in vivo, přičemž výsledky se liší derivát od derivátu³. Díky antibakteriálním účinkům se SA začali používat v antibioticích.

Rozmachem penicilinu byly SA nahrazeny v lidských antibioticích. Především k tomu vedla řada nežádoucích vedlejších účinků. SA mohou vést k hepatitidě⁴, artritidě⁵ a vyvolat alergické reakce⁶. Díky své efektivitě, nízkým nákladům a širokému účinku se SA stále uplatňují jako antimikrobiální látky a využívají se u léčby infekcí močových cest⁷, chronické bronchitidy a zánětlivých onemocnění střev^{8,9}.

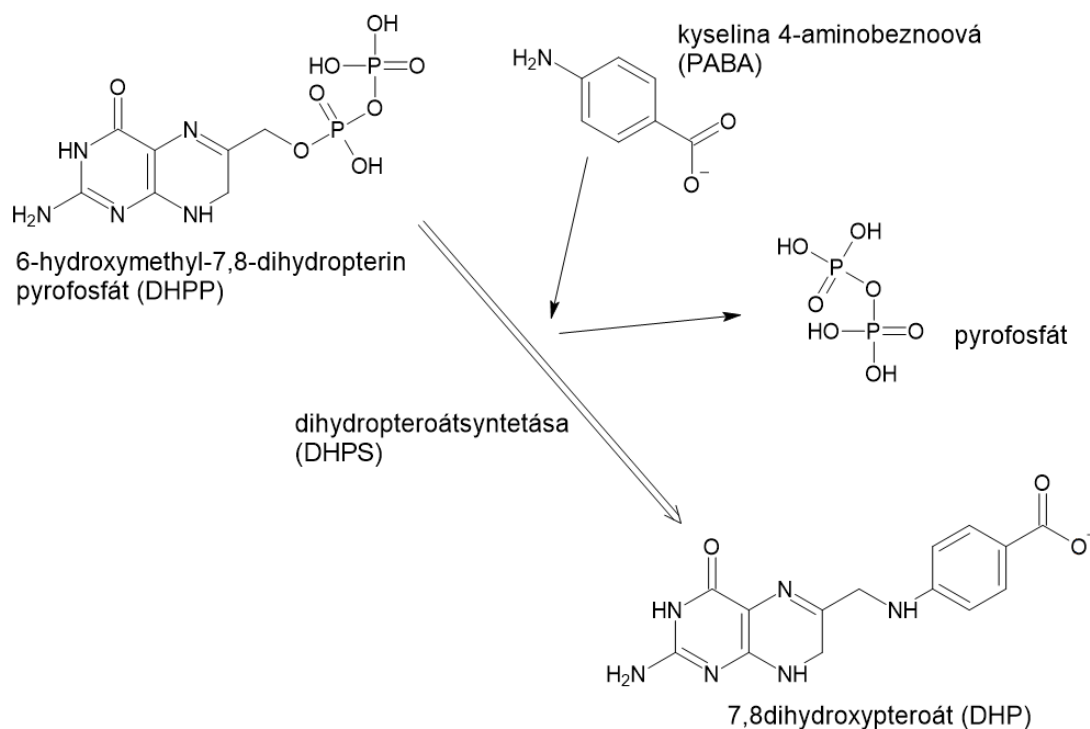
Sulfonamidy (SA) se z lidských antibiotik přesunuli do veterinářského průmyslu a začaly se ve velkém používat jako antimikrobiotikum podávané zvířatům. Léčba nemocí se neochotou k přijímání vody a potravy u infikovaných jedinců vydala cestou prevence. Antibiotika se začali přidávat průmyslově chovaným zvířatům do jídla. Kromě prevence vůči infekci podporují antibiotika růst zvířat, což vedlo k popularizaci jejich užití¹⁰. Ve Spojených státech amerických se 80 % užitých antibiotik v roce 2023 spotřebuje jako doplněk stravy průmyslově chovaných zvířat¹¹.

Mohutné využití SA ve veterinářství mělo za následek nárůst zastoupení SA v půdě, vodě a potravinách, což vedlo k obavám, jaké následky mohou mít SA které se skrze potravinový řetězec dostanou do člověka, na lidský organismus. Kromě zmíněných toxických vlivů SA, byly objeveny karcinogenní účinky¹². Zároveň se používáním SA ve veterinářství zvyšuje šance na mutaci bakterií, které si vytvoří rezistenci vůči účinkům SA, kterou poté mohou předat lidským patogenům a SA poté ztratí své využití v medicíně^{6,12}.

Další nebezpečí spojené se SA souvisí s jejich environmentální stoupou. SA se dostávají do půdy skrze zvířata. Velikost zamoření souvisí s pH půdy a hlavně s dobou vystavení. Nejvíce SA pohlcuje půda s mírně kyselým pH¹³. Zamoření vod SA vede ke vzniku nejvyššího množství imunních bakterií a zároveň je cestou SA do organismů žijících ve vodě. Ve vodních plochách se nachází řada mikroorganismů, jejichž diversitu mohou SA ohrozit¹⁴. Skrze půdu a vodu se SA dostávají i do rostlin. Projevem, kterým se SA vyznačují v boji proti bakteriím, mohou ovlivnit rostliny stejně negativně, jako ovlivňují prokaryoty. SA mohou ohrozit růst a vývoj rostlin a hromadění SA v rostlinách se může stát další cestou k pronikání SA do lidského organismu¹⁵.

Sulfonamidy (SA) inhibují buněčný cyklus buněk. Bakterie nejsou vlivem SA usmrceny, ale je jim zabráněno v růstu a dalších funkcích. SA inhibují buněčný cyklus intervencí do syntézy kyseliny listové. Kyselina listová neboli vitamin B9 je nezbytný kofaktor enzymů k přípravě nukleonových kyselin DNA a RNA a dalších aminokyselin¹⁶. Na rozdíl od heterotrofů, kteří kyselinu listovou přijímají v potravě, si většina prokaryot a rostlin vytváří kyselinu listovou sama, právě díky universálnosti této vlastnosti působí SA na širokou řadu bakterií a zároveň nepoškozují hostitele, kteří přijímají kyselinu listovou v potravě³.

Sulfonamidy (SA) inhibují syntézu kyseliny listové tím, že se váží na aktivní místo enzymu dihydroptoátsyntetázy (DHPS). Dihydroptoátsyntetáza (DHPS) se uplatňuje u syntézy 7,8-dihydroxypteroátu (DHP) z kyseliny 4-aminobezoové (PABA) a 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterinpyrofosfátu (DHPP). Rovnice vzniku DHP je zobrazena na Obr. 2. SA fungují jako antagonisté PABA a váží se na aktivní místo enzymu místo něj. SA se chovají jako klasické inhibitory a jejich účinek závisí na koncentraci, pH, teplotě a použitém derivátu. Prokaryoty, které si vytvořily imunitu na účinky SA, změnily pomocí mutace enzym DHPS. Pozměněné aktivní místo enzymu změnilo afinitu vůči SA a reakce už jeho vlivem není inhibována^{3,17,18}.



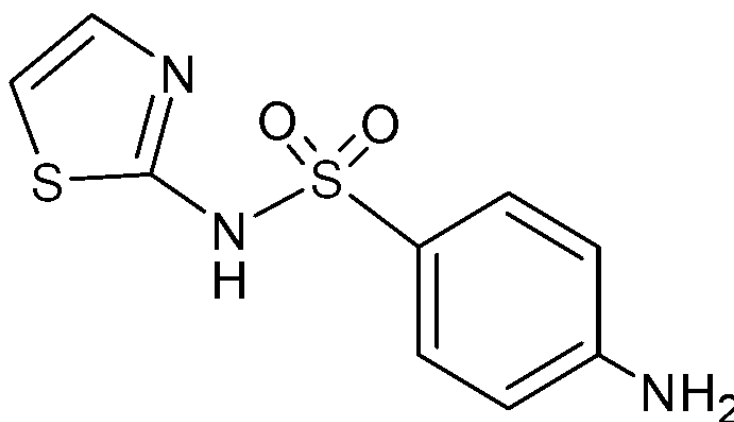
Obr. 2: Biosyntéza 7,8-dihydroxypteroátu. Na obrázku je vidět syntéza DHP, kterou SA inhibují navázáním se do aktivního místa DHPS namísto PABA¹⁸.

Kvůli toxickým účinkům na lidské zdraví a environmentálnímu nebezpečí spojenému s přidáváním SA do krmiva zvířat byly zavedeny sankce na jejich používání¹⁹. Z toho důvodu vzrostl zájem o nalezení funkční metody pro stanovení SA pro určení stupně zamoření krajiny a velikosti zastoupení SA v potravě.

Mezi analytické metody použité ke stanovení a detekci sulfonamidů v potravinách patří: vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) používající UV²⁰ nebo fluorescenční⁶ detekce a plynná chromatografie²². Stanovení technikou HPLC dosahovalo pro sulfamethoxazol limitu detekce $L_D \approx 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, cit.⁴⁷. Tyto metody se i přes svou preciznost pojí s vysokými náklady a dlouhou dobou stanovení. Rychlou, levnou a nízko nákladovou alternativou bývají elektrochemické metody, které díky elektrochemickým vlastnostem SA spojených s aminovou a sulfonylovou skupinou je možné studovat. Byly provedeny voltametrická stanovení SA, která použili řadu pracovních elektrod. Do seznamu použitých elektrod patří elektroda ze skelného uhlíku (GCE)²³, elektroda z modifikované uhlíkové pasty (CPE)²⁴ a borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE). Mezi SA stanovené na borem dopované diamantové elektrodě (BDDE) patří sulfadiazin a sulfamethoxazol, které byly stanovené metodou square wave voltametrie (SWV) a dosáhli limitu detekce $2 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ pro sulfadiazin a $1 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ pro sulfamethaxole, cit.²⁵. Tyto SA byly také stanoveny pomocí HPLC s ampérometrickou detekcí využívající BDDE. Výsledky tohoto experimentu dosáhly skvělých limitů detekcí a lineárního rozsahu. Například pro sulfadiazin byl touto metodou docílen limit detekce $L_D = 4,4 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$, cit.²⁶.

2.2 Studovaná látka

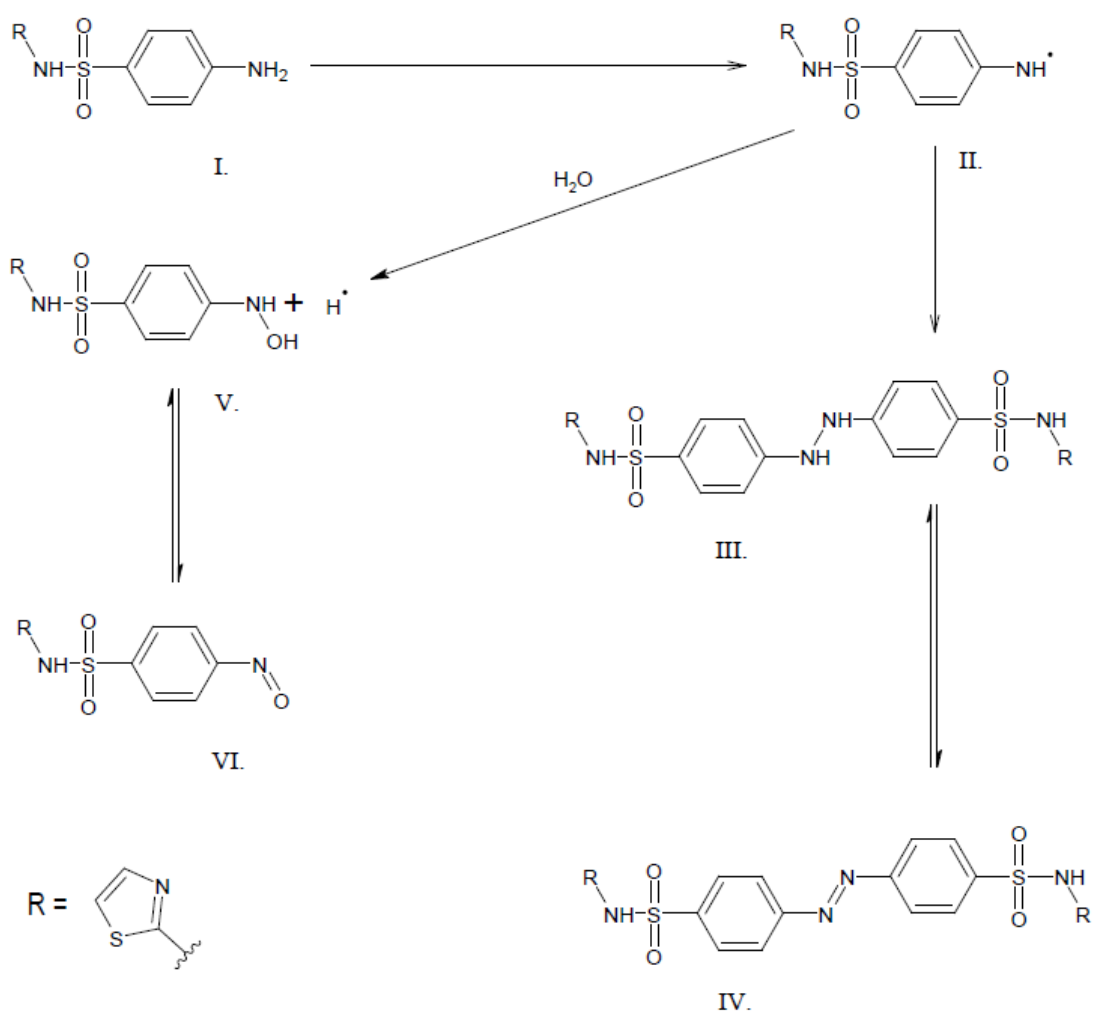
Tato práce se zabývá sulfathiazolem (STZ). STZ je bílý krystalický prášek, který patří mezi aminobenzensulfoamidy a podobně jako další SA projevuje antibakteriální účinky, kvůli kterým patří mezi běžně používané SA ve veterinářství. Krom toho nachází využití při léčbě povrchových zranění a v kombinaci s dalšími deriváty SA se používá proti vaginální infekci²⁷. Postranní řetězce STZ, které definují specifické využití derivátu, se skládají z thiazolu, navázaného přes dusík a anilinu navázaného přes sulfonylovou skupinu. Strukturní vzorec STZ je zobrazený na Obr. 3.



Obr. 3: strukturní vzorec sulfathiazolu.

Elektrochemické vlastnosti STZ vycházejí z amino skupiny postranního řetězce. Zatímco amino skupina postranního řetězce je ochotná k anodické oxidaci na platině a dalších elektrodách, amino skupina spojená se sulfonylovou skupinou a heterocyklem se na platinové elektrodě jeví inertní²⁸. Inertnost tohoto dusíku vůči elektrodě pravděpodobně vychází z toho, že π -elektrony dusíku jsou přitahovány heterocyklem. Elektronovou deprivaci si dusík částečně kompenzuje na elektronu vodíku, díky čemuž vzrůstá neochota k jeho odevzdání elektrodě.

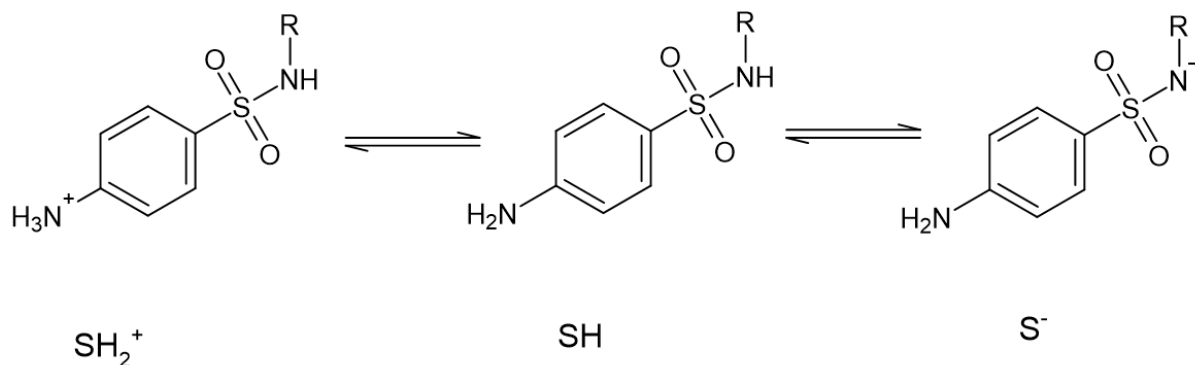
Mechanismus oxidace STZ byl studován na pyrolitické grafitové elektrodě. Na základě této studie oxidací STZ na elektrodě vzniká radikál. Radikál je deaktivován 2 způsoby. Prvním je vznik dimeru. Vzniklá hydrazon sloučenina se může oxidovat za spotřeby $2e^-$ a $2H^+$ a vzniku azosloučeniny, ta se částečně zpět redukuje. Druhým způsobem deaktivace je reakce s vodou, kterou vzniká hydroxyamino sloučenina. Ta přechází na nitroso molekulu, která se částečně také zpět redukuje.²⁹ Každé oxidoredukční reakci odpovídá vlastní pík a přehledný mechanismus je zobrazen na Obr. 4.



- I. = sulfathiazol
- II. = radikál sulfathiazolu
- III. = hydrazo sloučenina
- IV. = azosloučenina
- V. = hydroxyamin sloučenina
- VI. = nitroso sloučenina

Obr. 4: Navrhnutý mechanismus oxidace STZ. Převzatý z²⁹.

Elektrochemické vlastnosti látek se mohou vlivem pH měnit. STZ má 3 formy, ve kterých se vyskytuje v závislosti na pH, katodická forma SH_2^+ typická pro silně kyselé pH, neutrální forma SH a anodická forma S^- . Výskyt formy souvisí s hodnotou disociační konstanty pK_A . Pro STZ byly stanoveny disociační konstanty $pK_A = 2,2$ a $7,2$. Při $\text{pH} = 2,2$ je mezi SH_2^+ a SH rovnováha a při $\text{pH} = 7,2$ existuje rovnováha mezi SH a S^- formou³⁰. Na Obr. 5 jsou zobrazeny disociační formy STZ. Zajímavé je, že odstupující vodík v bazickém prostředí se odděluje od aminové skupiny napojené na sulfonylovou, nikoli z aminové skupiny na aromatickém kruhu. Z toho lze usuzovat, že heterocyklus snižuje elektronovou hustotu více nežli aromatické jádro, i přes kladný mezomerní efekt aminové skupiny.



Obr. 5: Předpokládané acidobazické formy sulfonamidů. Převzato z³⁰.

Podobně jako jiné SA byl podroben STZ elektrochemickým experimentům, které si kladli za cíl jeho stanovení. Mezi techniky použité k jeho stanovení patří square wave voltametrie (SWV), diferenciální pulsní voltametrie (DPV), cyklická voltametrie (CV) a také amperometrické techniky. STZ se svou rozpustností ve vodě $1,9 \text{ mmol l}^{-1}$, cit.³¹, řadí mezi látky ve vodě špatně rozpustné, z toho důvodu se k jeho rozpuštění použil v mnoha experimentech methanol či acetonitril, ve kterých má dobrou rozpustnost. Ve většině studií bylo použito pH mezi hodnotami 6,0 až 7,4 a jako elektrolyt dominoval Britton-Robinsonův (BR) a fosfátový pufr, přičemž použití fosfátového pufru vedlo ke zdvojnásobení citlivosti oproti Britton-Robinsonově (BR) pufru při stanovení metodou katodická rozpouštěcí voltametrie (CSV)³². Mezi pracovní elektrody použité v těchto experimentech dominují elektrody ze skelného uhlíku (GCE) a elektrody z uhlíkové pasty (CPE) některé obdařené modifikacemi. Shrnutí všech doposud použitých elektrochemických metod pro stanovení STZ je k dispozici v Tabulce 1.

Tabulka 1: Souhrn všech doposud použitých elektrochemických metod na stanovení STZ. Obsahující informaci o použité elektrodě, metodě, lineárnímu rozsahu, limitu detekce a potenciálu píku.

metoda	elektroda	elektrolyt	Lineární rozsah [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Limit detekce [nmol l^{-1}]	E_p [V]	cit
SWV	GCE+ P3MT	BR pufr (pH = 6,28) methanol (w = 0,1%)	$9.7 \cdot 10^{-2}$ až 50	64	0,86, -2,99	33
HDVs	GCE	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pufr (pH= 6,2) Ethanol (5%)	2 až 400	2000	-	34
HDA	GCE	fosfátový pufr(pH= 3) acetonnitryl, methanol (80:15:5)	$2 \cdot 10^{-3}$ až 20	9,0	0,9	19
SWV	CPE	methanol fosfátový pufr(pH = 6) (poměr neuveden)	1 až 10,0	1200	-	44
PAD	PCAuE	fosfátový pufr (pH =7) ACN (w=10%)	$5 \cdot 10^{-2}$ až 100	50	0,9-1,2	43
CV	GCE	Na_2SO_2 (0,5 mol l^{-1}) (pH = 7,5)	-	-	1,5, -0,5	35
DPV	GCE+ TASV	fosfátový pufr (0,1 mol l^{-1}) (pH = 7)	$1 \cdot 10^{-2}$ až 364	1,0	0,9	36
CSV	GCE	BR pufr (pH = 6,0)	-	-	-0,25	32
CSV	GCE	Cu(II) (50 $\mu\text{mol l}^{-1}$) BR pufr (pH = 6,0)	$1 \cdot 10^{-2}$ až 0,15	1	-0,4	32

Seznam zkratk: **CV** = cyklická voltametrie, **DPV** = diferenciální pulsní voltametrie, **SWV** = square wave voltammetry, **GCE** = skelný uhlík, **P3MT** = poly(3-methylthiophen), **HDVs** = Hydrodynamická voltametrie, **HDA** = hydrodynamická amperometrie, **PAD** = pulsní amperometrická detekce, **PCAuE** = polykrystalická zlatá elektroda, **CSV** = katodická rozpouštěcí voltametrie, **CPE** = elektroda z uhlíkové pasty, **TASV** = $\text{Ti}_3\text{AlC}_2@\text{SmVO}_4$,

2.3 Borem dopovaná diamantová elektroda

Diamant je známý díky vysoké tvrdosti, skvělé vodivosti tepla a chemické stabilitě. Díky vysoké rezistivitě se nedopovaný diamant používá jako elektrický izolátor. Nicméně příměsemi, mezi které patří: bor, dusík, fosfor, se z diamantu stává polovodič, přičemž nepoužívanější je bor, díky nízké aktivační energii nosiče náboje, jejíž hodnota je 0,37 eV. Borem dopovaný diamant vytváří polovodič typu p, cit. ³⁷.

Při porovnání voltametrických křivek diamantové elektrody s elektrodou ze skelného uhlíku, platiny a zlata se objevuje jednoznačná výhoda diamantové elektrody v širokém potenciálovém okně, které dosahuje až tří voltů. Díky širokému potenciálovému oknu se BDDE uplatňují v potenciálech, kde jiné elektrody nemohou ^{38, 39}. Ve vodných roztocích probíhá na BDDE evoluce vodíku až při $-1,25$ V a evoluce kyslíku při $+2,3$ V, cit. ⁴⁰. Na BDDE dochází k přepětí, které vytváří potenciálové okno, které je největší z běžně používaných pracovních elektrod při použití vodných roztoků jako elektrolytů.

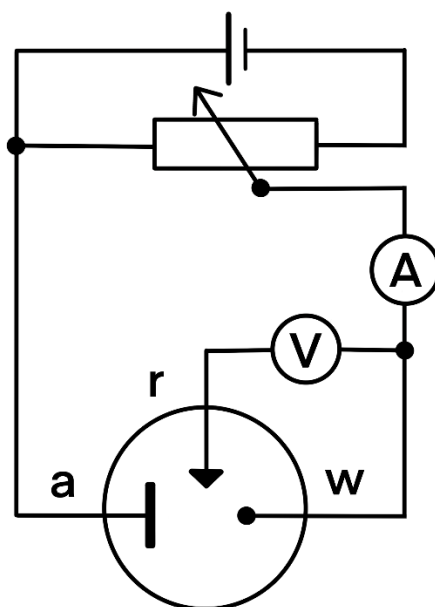
Další výhodou BDDE je vysoká chemická stabilita oproti jiným uhlíkovým elektrodám. Při vystavení agresivním látkám jako kyselina fluorovodíková či chlorovodíková, se na BDDE neobjevuje žádné patrné poškození za podmínek, které vedou k rychlému poškození GCE ⁴¹.

Při elektrochemickém měření dochází na elektrodách k adsorpci polárních látek na povrch elektrody. Tato reakce může vést k pasivaci elektrody. Při voltametrickém měření přeměny ferro/ferrikyanidu prokázala BDDE pozoruhodnou odolnost vůči pasivaci ⁴¹.

2.4 Metody stanovení

Elektrochemické metody se zabývají měřením proudu, potenciálu a náboje a jejich vztahem k chemickým parametrům látky. Nabývají široké využití v analytické chemii, do kterého například patří: monitorování škodlivých látek v prostředí, kontrola průmyslové kvality produktů anebo studium medicínálních látek. Výhodou těchto metod je velká citlivost, finanční nenáročnost a selektivita na elektrochemicky aktivní látky, díky čemuž představují alternativu ke spektrofotometrickým a separačním metodám.

Při voltametrii se sleduje závislost proudu, procházejícího pracovní elektrodou, na potenciálu. V tříelektrodevém uspořádání, které se skládá z referenční, pracovní a pomocné elektrody, prochází proud mezi pracovní a pomocnou elektrodou a potenciál pracovní elektrody se měří mezi pracovní a referenční elektrodou. Výhodou tohoto uspořádání oproti dvouelektrodevému je, že referenční elektrodou neprochází proud, který by způsobil změnu potenciálu referenční elektrody a určený potenciál by byl zatížen chybou⁴². Způsob zapojení tříelektrodevého systému je zobrazen na Obr. 6.



Obr. 6: Zapojení tříelektrodevého systému pro voltametrické měření, kde „w“ představuje pracovní, „r“ referenční a „a“ pomocnou elektrodu. Převzato a upraveno z⁴².

Diferenciální pulsní voltametrie je metoda, při které se potenciál překládá napět'ovým pulsem a zaznamenáván je rozdíl proudu těsně před a na konci potenciálového pulsu. Výhodou pulsní metody je snížení kapacitního proudu, který neneser informaci o analytu a projevuje se tedy jako šum. Z toho důvodu dosahuje DPV nižších mezí detekce. Signál analytu se na voltagramu zobrazuje jako pík. Píky bývají symetrické a ostré a oproti jiným metodám zjednodušují vyhodnocení. Potenciál píku podává kvalitativní údaj o analytu a proud kvantitativní. Metoda je proto použitelná, jak na kvalitativní, tak kvantitativní stanovení a na rozdíl od klasické voltametrie s lineárně rostoucím potenciálem má vyšší rozlišitelnost⁴².

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Reagencie

Zásobní roztok STZ o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 2,6 mg pevného STZ, který byl navážen na analytických vahách, v 10 ml destilované vody. Pro úplné rozpuštění byl roztok sonifikován po dobu 20 minut. Roztoky o nižší koncentraci byly připravené přesným ředěním tohoto zásobního roztoku. Zásobní roztok byl uchováván v chladu a za tmy v ledničce.

Brittonův-Robinsonův pufr o požadovaném pH byl připraven smícháním kyselé a zásadité složky BR pufru ve správném poměru. Zásaditou složku představoval $c = 0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ hydroxid sodný a kyselou roztok se třemi kyselinami: octovou, boritou a fosforečnou s koncentrací každé kyseliny $c = 0,04 \text{ mol l}^{-1}$.

K leštění a obnově povrchu pracovní elektrody byla použita suspenze aluminy. Ta byla připravena rozpuštěním oxidu hlinitého (velikost částic $0,5 \mu\text{m}$, Lach-Ner, Česká republika) v deionizované vodě v objemovém poměru 1:4 a 10 minutovou sonifikací v ultrazvuku.

K přípravě roztoků byla použita deionizovaná voda (rezistivita $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, produkční systém Milli-Q Plus, Millipore, USA). Se všemi roztoky se pracovalo za použití skleněných nádob.

3.2 Aparatura

Voltametrická měření proběhla na přístroji PGSTAT 204 (Metrohm, Česká republika) Měřicím programem byla Nova 2.1.5. (Metrohm, Česká republika). Tříelektrodový systém se skládal z referenční argentschloridové elektrody ($\text{Ag} \mid \text{AgCl} \mid 3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ KCl}$), z pomocné platinové elektrody a pracovní elektrody, jako která byla použita desková BDDE (BioLogic, Francie, průměr disku $3,0 \text{ mm}$ a ploše $7,1 \text{ mm}^2$)

Pro přesné určení pH byl použit digitální pH-metr Jenway 3510 s kombinovanou iontově selektivní skleněnou elektrodou (Jenway, UK). Ke kalibraci pH metru byly použity standartní pufrů (Sigma-Aldrich Chemie, USA) s hodnotou pH 4,0, 7,0 a 9,0.

STZ byl navážen pomocí analytických vah (Nimbus, Adam Equipment, UK).

3.3 Pracovní postup

Voltametrické měření

Všechna voltametrická měření byla provedena za laboratorní teploty a tlaku. Nejdříve byl připraven BR pufr o patřičném pH. Pomocí automatické pipety bylo převedeno 10,0 ml roztoku do voltametrické nádoby. Přímo do voltametrické nádoby bylo napipetováno odpovídající množství studované látky z jeho zásobního roztoku o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. Takto připravený roztok byl promíchán a byl proveden voltametrický záznam. Všechny křivky byly měřeny třikrát a statisticky vyhodnocené pomocí mediánu a opatřeny intervalem spolehlivosti na hladině významnosti 95%. Během měření opakovatelnosti bylo provedeno 15 záznamů. Před měřením v redukční oblasti byl roztok probubláván dusíkem po dobu 5 minut.

Před každým měřením nebo alespoň na začátku série měření byla elektroda očištěna deionizovanou vodou, důkladně vyleštěna na podložce zvlhčené suspenzí aluminy a nakonec znovu opláchnuta.

Měření metodou DPV probíhala v rozsahu $-0,25$ až $1,25$ V s potenciálovým krokem $E_s = 3$ mV, s modulační amplitudou $E_A = 50$ mV, s klidovým časem před pulsem $t_k = 153$ ms, s modulačním časem pulsu $t_m = 100$ ms, s rychlostí skenu $v_s = 20$ mV s⁻¹

Mez stavitelnosti a detekce

Mez detekce představuje nejnižší koncentraci, která je ještě rozeznatelná od šumu signálu a v této práci slouží k porovnání s jinými metodami. Pro její výpočet byla použita rovnice:

$$L_D = \frac{3 \cdot s}{a} \quad (1)$$

Mez stavitelnosti odpovídá nejnižší koncentraci, kterou lze použít pro analytické stanovení:

$$L_Q = \frac{10 \cdot s}{a} \quad (2)$$

Veličina s odpovídá směrodatné odchylce a a je směrnice přímky kalibrační závislosti.

Lineární dynamický rozsah

Reprezentuje koncentrační rozsah složky, při které je hodnota velikosti píku přímo úměrná koncentraci analytu. LDR byl vyhodnocen na základě rovnice:

$$k = \frac{\log|I_p - b| - \log|a|}{\log|c|} \quad (3)$$

Kde hodnoty proměnných a a b vycházejí z rovnice lineární závislosti koncentrace proudu na píku. Hodnota I_p představuje průměrnou hodnotu proudu při koncentraci c . Lineární dynamický rozsah splňují hodnoty s koeficientem k mezi 0,95 až 1,05, tedy s tolerancí 5%, cit^{45, 46}.

Grafy byly sestaveny v programu Origin Pro 8 a statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Microsoft Excel 2016.

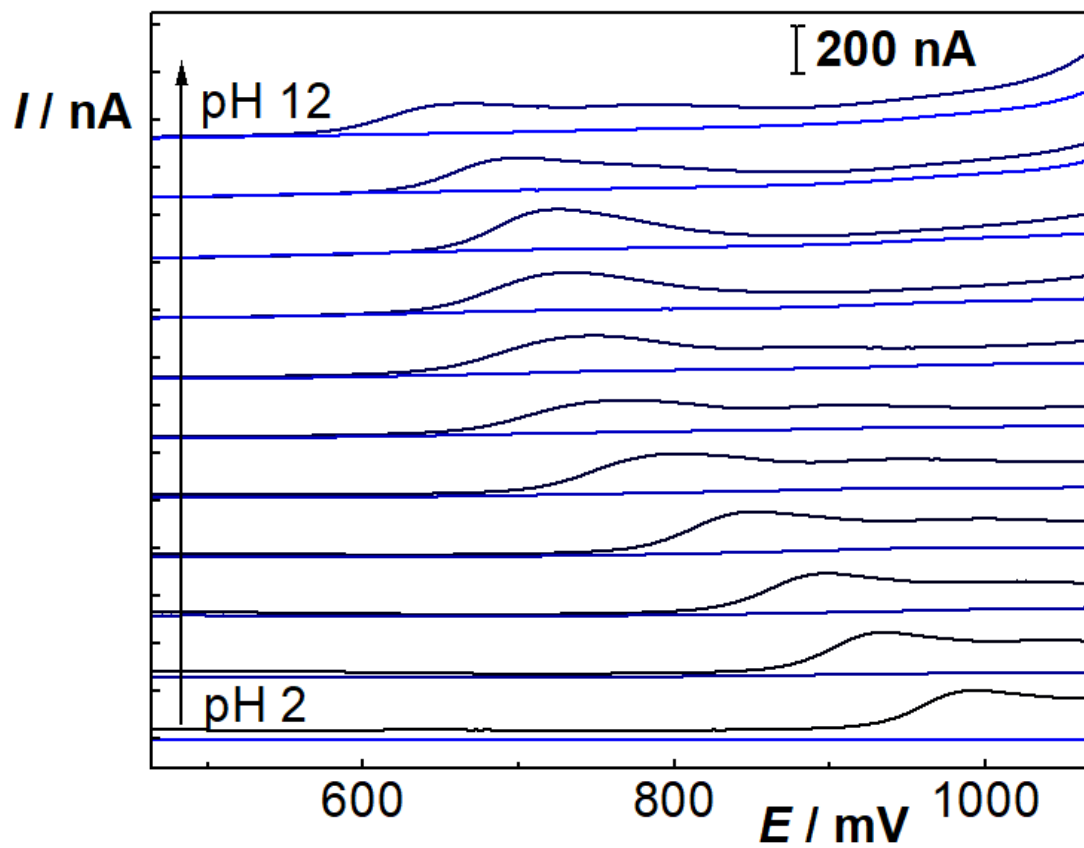
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace pH

Bylo provedeno měření, jehož cílem bylo určit optimální pH pro stanovení STZ. Vliv pH na chování STZ byl sledován metodou DPV na BDDE. STZ byl zkoumán v prostředí BR pufru o pH 2,0 až 12,0. Elektrochemické vlastnosti byly studovány v kladné i záporné oblasti pro pH 2,0 a 3,0. Redukční část neposkytovala žádný výrazný signál. Z toho důvodu se redukční část opustila a dále byly zkoumány pouze signály při kladných potenciálech. Látka poskytovala výrazný první pík pro všechna pH, který se s rostoucím pH rozvlnil, a menší druhý pík patrný při pH 3,0 až 6,0. Voltametrické křivky pro jednotlivá pH jsou zobrazeny na Obr. 7.

Nejdříve bylo provedeno voltametrické měření při koncentraci $50 \mu\text{mol l}^{-1}$. Při tomto měření byla elektroda leštěna před každou sérií. Byly sestaveny grafy závislosti pH a potenciálu píku Obr. 8 a pH na proudu píku Obr. 9. Graf závislosti pH na proudu píku byl zatížen malou opakovatelností, která souvisela pravděpodobně s pasivací elektrody. Tuto skutečnost dokládá fakt, že proud píku v sérii postupně klesal napříč hodnotami pH. Výjimkou jsou pH 6 a 7, které byly provedeny s jinou předúpravou elektrody. Při těchto stanovení byla elektroda leštěna před každým měřením, aby bylo zabráněno pasivaci, a z toho důvodu dosahují tyto měření lepší opakovatelnosti. I přes to se tyto měření zdají nepřesné při porovnáním s hodnotami dosaženými následně při kalibračních měření za optimálních podmínek.

Kvůli nepřesnosti prvního experimentu bylo provedeno druhé sledování vlivu pH v koncentraci $10 \mu\text{mol l}^{-1}$, při kterém by vliv pasivace měl být menší. Zároveň byla při tomto stanovení elektroda leštěna před každým měřením. Při druhém experimentu se podařilo pasivaci elektrody zabránit v rámci možností, díky čemuž bylo dosaženo lepší opakovatelnosti. Pro tuto předúpravu elektrody byly sestaveny grafy závislosti pH a potenciálu píku Obr. 10 a pH na proudu píku Obr. 11.



Obr. 7: Závislost proudu na potenciálu STZ ($c = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$) měřeno DPV na BDDE v prostředí BR pufru o pH od 2 do 12.

Každému píku byla nalezena hodnota potenciálu E_p a proudu I_p , které jsou pro jednotlivá pH zaznamenána v Tabulce 2. Hodnoty potenciálu píku byly vloženy do grafu, Obr. 10, v závislosti na pH. Pomocí lineární regrese byla vypočtena závislost potenciálu píku na pH roztoku. Pro druhý pík objevující se v rozmezí pH 3 až 6:

$$E_p = 551 \pm 7 \text{ [mV]} - (57 \pm 1) \text{ pH} \quad (4)$$

Tato lineární regrese dosahuje Pearsonova koeficientu $R^2 = 0,9998$. Směrnice druhého píku dosahuje hodnoty -57 ± 1 mV. Tato hodnota se blíží hodnotě -59 mV. Při velikosti směrnice -59 mV by se během elektrochemické reakce vyměňovalo stejné množství elektronů a vodíkových protonů. Tento pík je pravděpodobně vytvářen vedlejší reakcí, která probíhá při oxidaci STZ, zobrazené na Obr. 4. Na základě literatury [29] tento pík souvisí s přeměnou hydroxyamino sloučeniny na nitro sloučeninu, která se objevuje pouze v kyselém pH. Vzhledem k tomu, že tento pík dosahoval nižšího proudu píku a je spojen s vedlejší reakcí oxidace STZ, nebyl nadále sledován a vyhodnocován.

Pro první pík objevující se v celém rozsahu pH byly nalezeny vztahy:

Pro kyselé a neutrální pH:

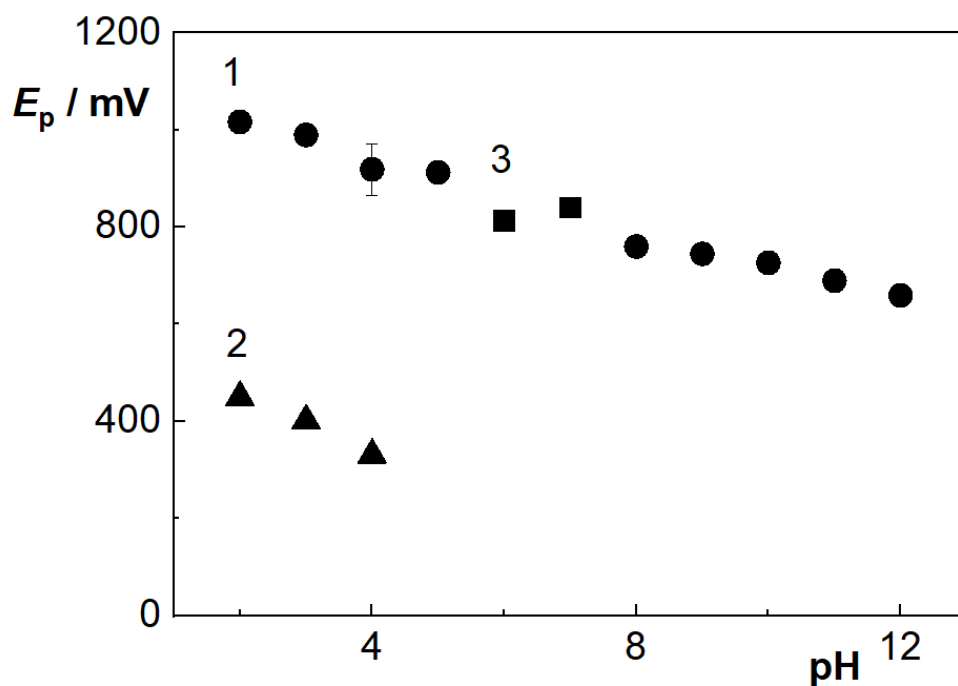
$$E_p = 1080 \pm 8 \text{ [mV]} - (47 \pm 2) \text{ pH} \quad (5)$$

Pro zásadité pH:

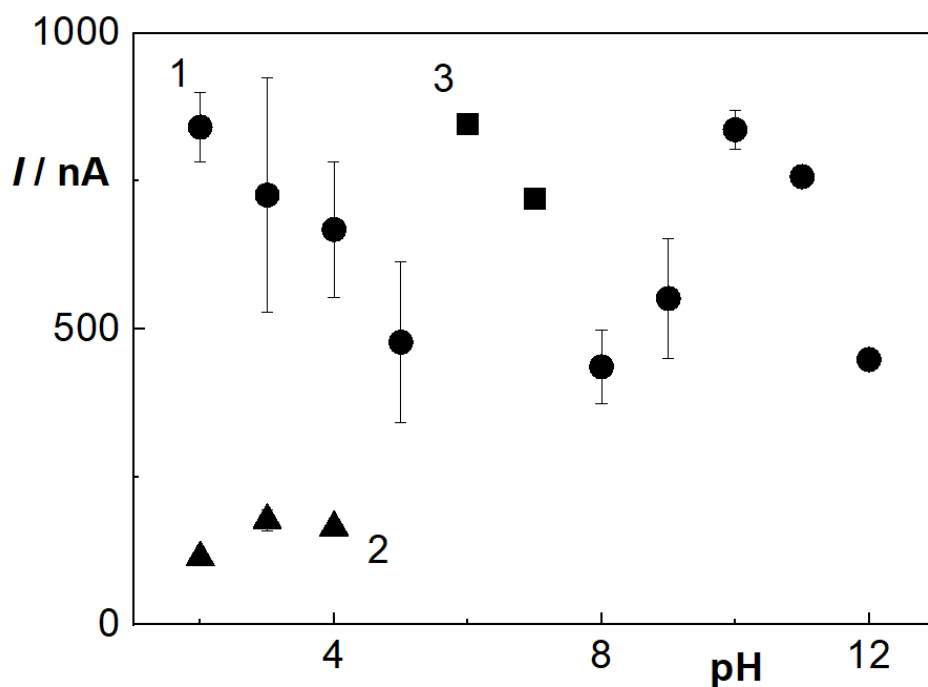
$$E_p = 1019 \pm 39 \text{ [mV]} - (31 \pm 4) \text{ pH} \quad (6)$$

Rovnice (5) regrese kyselého a neutrálního pH dosahuje $R^2 = 0,9943$ a zásaditého (6) $R^2 = 0,9868$. Všechny přímky regrese byly vytvořeny na základě Obr. 10.

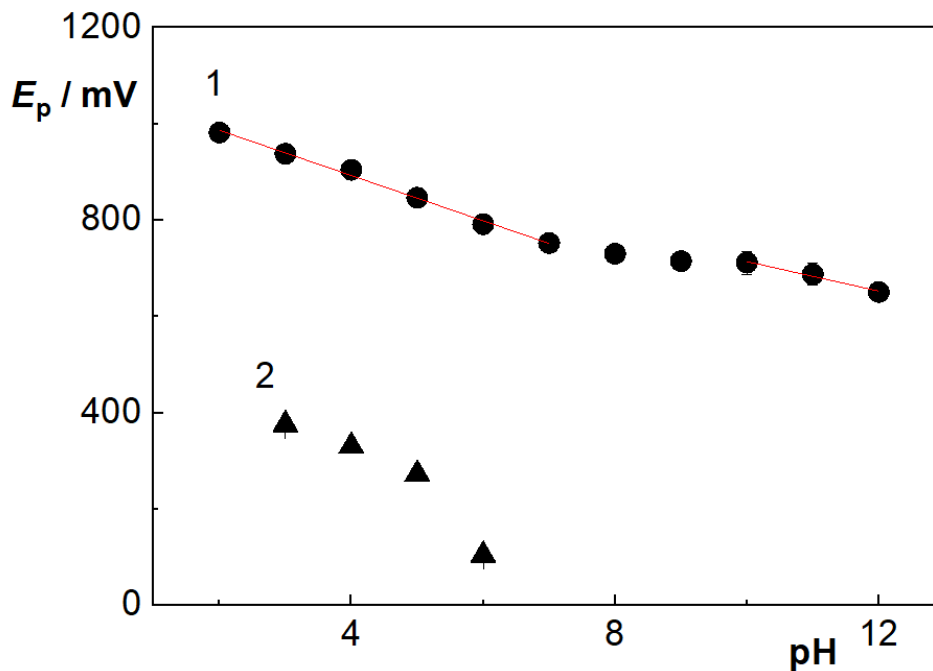
První pík vyskytující se v celém zkoumaném rozsahu pH je vytvářen jak samotnou oxidací STZ, tak i následnou reakcí, při které vzniká azosloučenina. K této domněnce připívá skutečnost, že se další pík v oxidativní části neobjevuje. Zároveň to vysvětluje rozvlnění prvního píku po zániku druhého píku. Pík oxidace STZ a přeměny dimeru na azosloučeninu jsou pravděpodobně blízko u sebe, a tudíž těžko rozeznatelné. V kyselých oblastech část produktu oxidace STZ vstupuje do vedlejší reakce a pík vyvolaný oxidací dimeru je méně patrný. Od $\text{pH} = 7$ se veškerá oxidovaná forma STZ přeměňuje na dimer a pík se stává výraznější, což se projevuje rozvlněním prvního píku, který v sobě ve skutečnosti skrývá 2 píky. Druhý pík v kyselém pH poskytuje přibližně 50krát menší proud píku, než první pík. Není zřejmé, jak velký proud vytváří oxidace dimeru, ale je možné, že vytváří natolik malý proud, že při porovnání s velkým píkem je těžko rozeznatelný, což vedlo k tomu, že byly oba píky zahrnuty při stanovení do jednoho.



Obr. 8: Závislost potenciálu píku STZ ($c = 50 \mu\text{mol l}^{-1}$) měřeno DPV na BDDE v prostředí BR puřem o pH od 2 do 12. Tečky zaznamenávají potenciál prvního píku (1) trojúhelníky druhého (2). Čtverečky zaznamenávají potenciál prvního píku s jinou předúpravou (3).

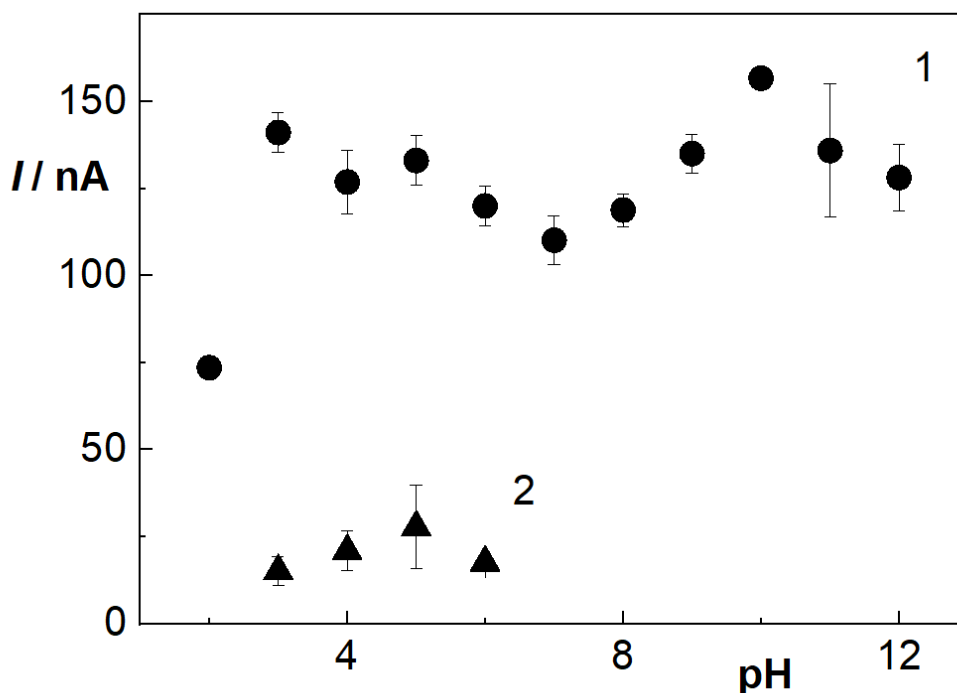


Obr. 9: Závislost proudu píku STZ ($c = 50 \mu\text{mol l}^{-1}$) měřeno DPV na BDDE v prostředí BR puřem o pH od 2 do 12. Tečky zaznamenávají potenciál prvního píku (1) trojúhelníky druhého (2), při kterých byla elektroda leštěna před sérií. Čtverečky zaznamenávají potenciál prvního píku (3), při které bylo leštěno před každým měřením.



Obr. 10: Závislost potenciálu píku STZ ($c = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$) měřeno DPV s BDDE v prostředí BR pufrů o pH 2 až 12. Tečky zaznamenávají potenciál prvního píku (1) trojúhelníky druhého.(2) Při tomto měření bylo leštěno před každým měřením.

Z Obr. 10 je patrné, že s rostoucí hodnotou pH postupně klesá potenciál píku. Tento pokles se od linearity oddaluje u neutrálních a bazických hodnot. Toto vychýlení s největší pravděpodobností souvisí se změnou mechanismu přeměny STZ. U neutrálních a bazických hodnot oxidovaná forma STZ nevstupuje do vedlejší reakce, což dokládá vymizení druhého píku, a místo toho je oxidována na dimer. Pík spojený s oxidací dimeru a pík samotné oxidace STZ společně vytváří první pík. Je možné, že se potenciál píků mění v závislosti na pH s jinou rychlostí, což by způsobilo, že se píky pohybují buď od sebe nebo k sobě, tak či tak by se změnil tvar hlavního píku. Následkem, takové změny, by bylo nepřesné vyhodnocení potenciálu píku, což má za následek odchýlení od linearity.



Obr. 11: Závislost proudu píku STZ ($c = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$) měřeno DPV s BDDE v prostředí BR pufrů o pH 2 až 12. Tečky zaznamenávají proud prvního píku trojúhelníky druhého. Při tomto měření bylo leštěno před každým měřením.

Optimální pH pro analytické stanovení by mělo poskytovat, co možná největší proud píku a dobrou opakovatelnost. Pro analýzu proudu píku byl vytvořen graf, Obr. 11, závislosti proudu píku na pH.

Proud píku roste mezi pH 2 až 3, posléze má sestupnou tendenci do pH 7 a mezi pH 7 až 10 pH roste, od pH 11 začíná opět klesat. V úseku pH 2 až 12 se objevují minima při pH 2 a 7. Nejvyššího proudu píku bylo dosaženo při pH 10.

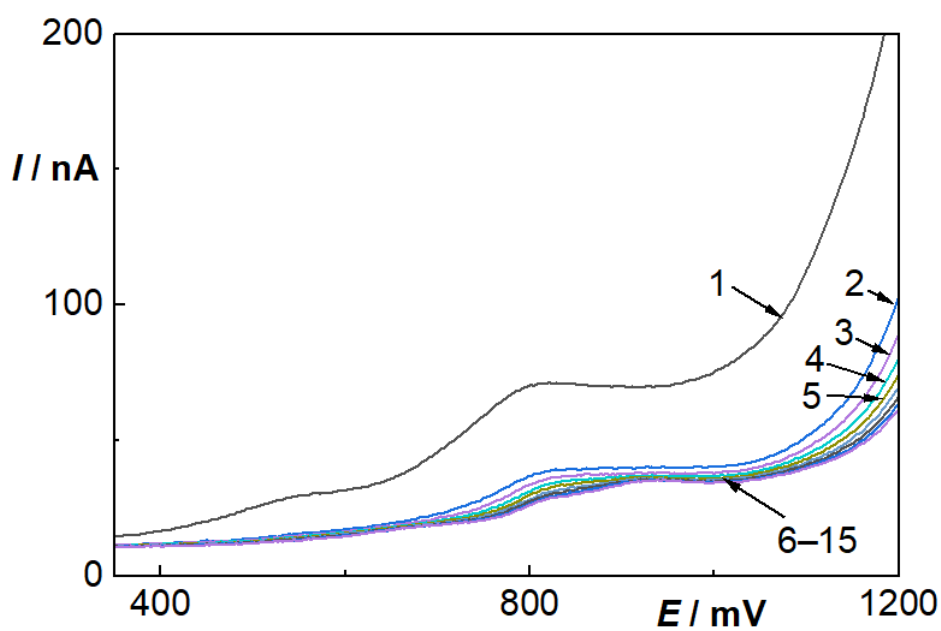
První lokální minimum odpovídá disociační konstantě protonizované formy sulfathiazolu SH_2^+ $pK_A = 2,2$. Nízké hodnoty proudu píky u pH 7 jsou ovlivněny přeměnou neutrální formy SH na bazickou formu S^- $pK_A = 7,4$. Rozdíl mezi proudem naměřeným při pH = 2 a pH = 10 je přibližně 80 nA a mezi pH = 7 a pH = 10 40 nA. Na základě toho to experimentu se zdá, že vliv pH nehraje tak významnou roli při vývoji metody stanovení STZ. Jako optimální pH bylo vybráno pH = 6. Při tomto pH bylo dosaženo leštěním před každým měřením relativní směrodatné odchylky $s_r = 5\%$, tudíž dosahuje dobré opakovatelnosti. Zároveň se objevuje dobře definovaný pík okolo $E_p \sim 800 \text{ mV}$. Při tomto pH by mírná změna pH během experimentu neměla pík významně změnit. Proudů a potenciálů jednotlivých píků jsou uvedeny pro jednotlivá pH v Tabulce 2.

Tabulka 2: Mediány potenciálů a proudů prvního ($E_{p,1}$, $I_{p,1}$) a druhého píku ($E_{p,2}$, $I_{p,2}$) s intervaly spolehlivosti pro jednotlivá pH. Měřeno DPV s BDDE při koncentraci STZ $c = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$ v prostředí BR pufru od pH 2 až 12.

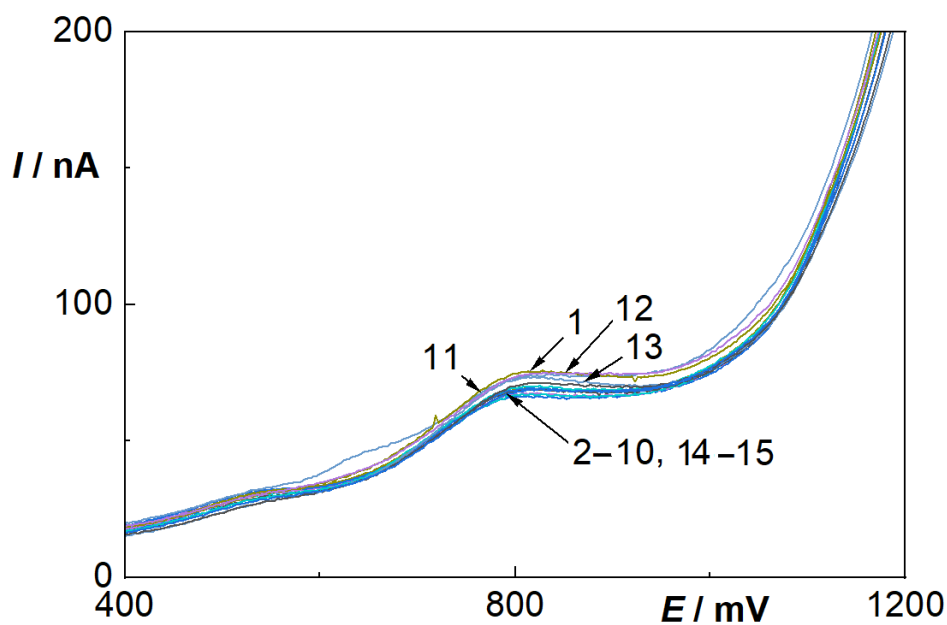
pH	$E_{p,1}$	$I_{p,1}$	$E_{p,2}$	$I_{p,2}$
	mV	nA	mV	nA
2	982 ± 3	74 ± 3		
3	938 ± 7	141 ± 6	376 ± 0	15 ± 6
4	905 ± 5	127 ± 10	331 ± 8	21 ± 8
5	847 ± 3	133 ± 8	273 ± 4	28 ± 17
6	792 ± 12	120 ± 7	104 ± 0	18 ± 0
7	752 ± 14	110 ± 8		
8	730 ± 20	119 ± 5		
9	715 ± 20	135 ± 6		
10	712 ± 27	157 ± 2		
11	687 ± 26	136 ± 22		
12	651 ± 13	128 ± 11		

4.2 Opakovatelnost

Metodou DPV v prostředí BR pufru o pH 6,0 byla změřena série, jejímž cílem bylo určení optimální úpravy pracovní elektrody před měřením. Bylo provedeno 15 opakujících se měření při koncentraci STZ $c = 10, 1$ a $0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$. Na základě předchozích experimentů byla očekávatelná pasivace elektrody. Z toho důvodu byly provedeny 2 typy měření. Při prvním byla elektroda leštěna suspenzí aluminu před začátkem série. Při druhém byla elektroda leštěna před každým měřením v sérii. Na Obr. 12 a Obr. 13 jsou uvedeny voltametrické křivky, které zobrazují rozdíl mezi metodou leštění před sérii a před každým měřením při koncentraci $c = 0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$.



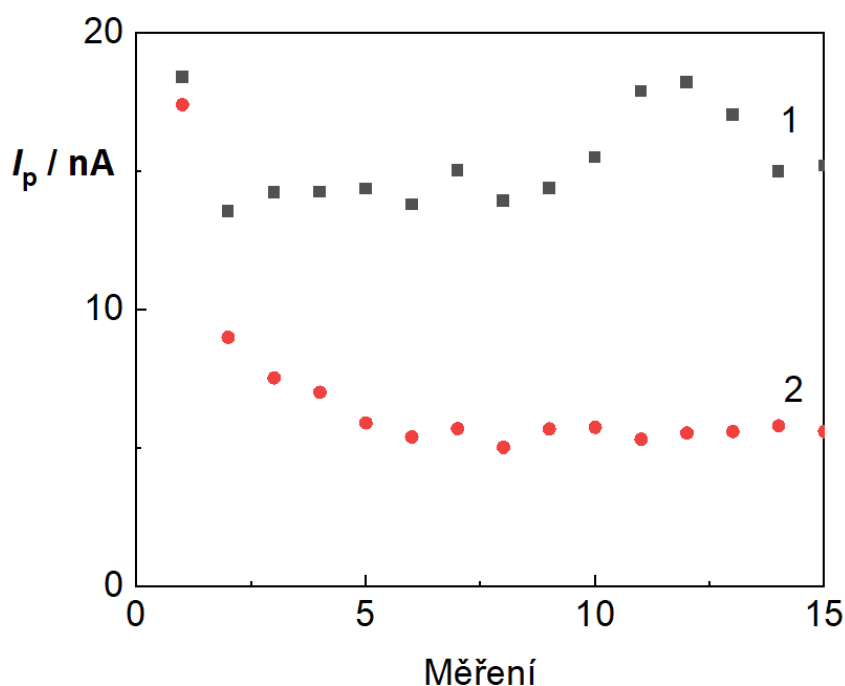
Obr. 12: 15 voltamogramů STZ ($c = 0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$) měřeno DPV na BDDE v prostředí BR pufru s $\text{pH} = 6$, při kterém byla elektroda leštěna pouze před začátkem série.



Obr. 13: 15 voltamogramů STZ ($c = 0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$) měřeno DPV na BDDE v prostředí BR pufru s $\text{pH} = 6$, při kterém byla elektroda leštěna před každým měřením v sérii.

Z Obr. 12 je patrné, že pro vybranou koncentraci $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ se již druhá voltametrická křivka výrazně propadne, pokud je elektroda leštěna pouze před prvním měřením, a následně postupně klesá, až se ustálí na stabilní hodnotě. Tyto voltametrické křivky vypovídají o pasivaci na povrchu elektrody, kterou se leštěním před začátkem měření série nepovedlo eliminovat. Naopak na základě Obr. 13 se zdá, že při leštění před každým měřením dosahují voltametrické křivky podobných hodnot velikosti píku. Rozdíl mezi metodami je přesněji zobrazen na Obr. 14.

Leštěním před sérii se nepodařilo zabránit pasivaci. Při tomto stanovení klesá výška píků až do určitého měření, kdy se ustálí a udržuje si stabilní hodnotu. Tato skutečnost se objevuje při koncentracích $c = 0,1$ a $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a indikuje nepoužitelnost tohoto postupu u těchto koncentrací. Naopak metodou leštění před každým měřením dosahují voltametrické křivky skoro stejných hodnot velikosti píku. Na Obr. 14 jsou zobrazeny obě metody předúpravy pracovní elektrody pro jejich porovnání. Pro jednotlivá měření byla spočítána relativní směrodatná odchylka, která je uvedena v Tabulce 3. Při leštění před sérii v koncentraci $c = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dochází k poklesu mezi prvním a druhým měřením. Od druhého měření se proud píku stabilizuje, díky tomu dosahuje toto měření přijatelné směrodatné odchylky, nicméně pasivaci nebylo zabráněno.



Obr. 14: Závislost proudu píku na čísle měření STZ ($c = 0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$) měřeno DPV na BDDE v prostředí BR pufru o $\text{pH} = 6$. Čtverečky (1) představují hodnoty proudu píku získané, když byla elektroda leštěna před každým měřením. a kruhové hodnoty (2) vyjadřují hodnoty proudu píku, když byla elektroda leštěna před sérii.

Z Obr. 14 je možné vyčíst, že při leštění před začátkem série dochází k postupné pasivaci elektrody až do šestého měření, kde se hodnota velikosti píku stabilizuje. Pokud by se první křivka, leštění před každým měřením, proložila regresní přímkou, tak by mírně stoupala. To je způsobeno chybou samotného leštění. Pro její zminimalizování byla elektroda ponořena do

isopropanolu pro odstranění organických zbytků, leštící destička byla promyta destilovanou vodou a byl vyměněn roztok v referenční elektrodě. I přes to se chyba nepodařila zcela eliminovat. Hodnoty směrodatných odchylek pro jednotlivé koncentrace pro obě metody jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Relativní směrodatné odchylky dvou typů leštění elektrody pro tři řádově odlišné koncentrace STZ. Měřeno DPV s BDDE v prostředí BR pufru s pH = 6.

c [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Leštění před každým měřením [%]	Leštění na začátku série [%]
10	5,7	7,1
1,0	5,1	18,8
0,1	10,8	53,9

Na základě směrodatných odchylek dosahují experimenty, při kterých byla elektroda leštěna před každým měřením, lepší opakovatelnosti ve všech změřených koncentračních řádech. Z toho důvodu by použití této předúpravy elektrody bylo ideální pro všechny další série.

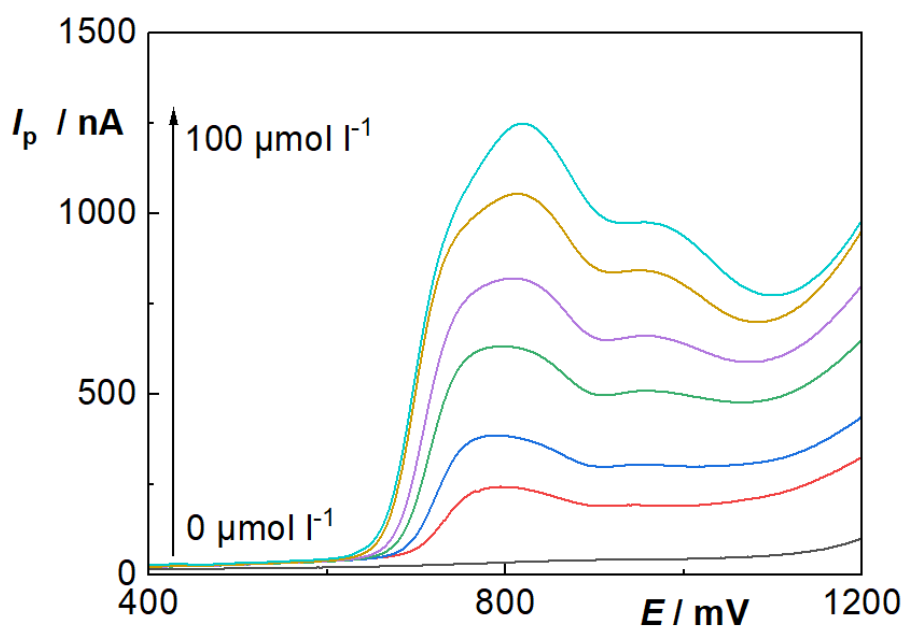
4.3 Kalibrační závislost

Byla proměřena koncentrační závislost STZ metodou DPV na BDDE. Měření proběhla na základě předchozí optimalizace v prostředí BR pufru o pH 6. Byl zkoumán koncentrační rozsah 0,1–1, 1–10 a 10–100 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Měření v koncentračním řádu 10–100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ proběhla s leštěním před sérii, zatímco pro řády 0,1–1 a 1–10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ byla elektroda leštěna před každým měřením.

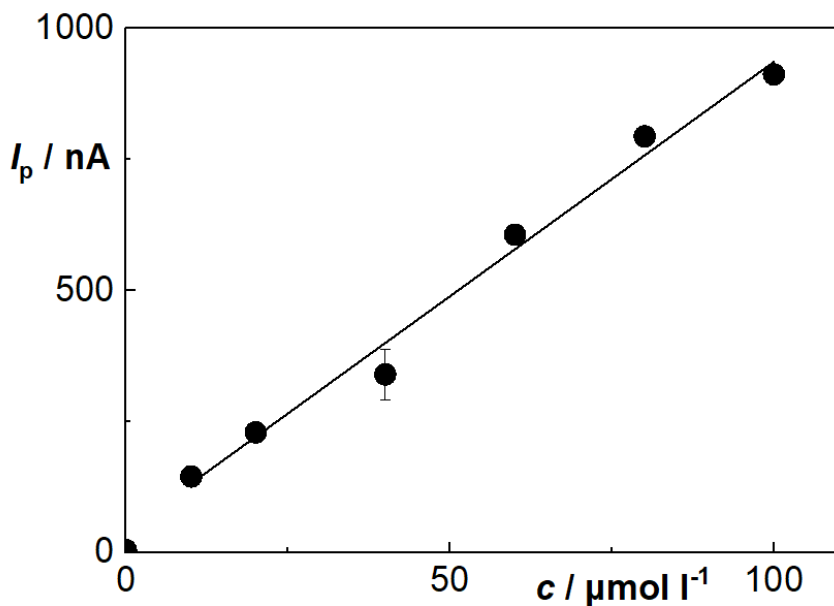
Pro koncentraci 10–100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ je voltametrická křivka oxidace STZ zobrazena na Obr. 15 a související koncentrační závislost na Obr. 16. Voltamogramy a kalibrační závislost koncentrace 1–10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ jsou ukázány na Obr. 17 a 18. Měření v koncentračním rozsahu 0,1–1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ jsou zaznamenána na Obr. 19 a 20. V Tabulce 4 se nacházejí informace o parametrech jednotlivých měření společně se statistickými koeficienty.

Tabulka 4: Parametry kalibračních křivek a statistické vyhodnocení oxidačního stanovení STZ měřeno DPV na BDDE v prostředí BR pufru o pH 6.

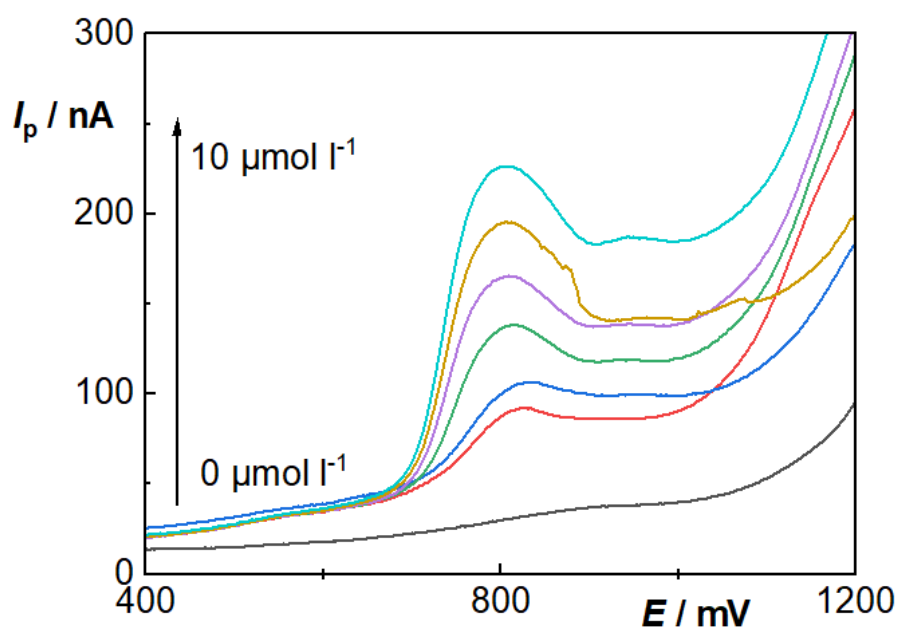
Koncentrace [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Směrnice [$\text{nA l} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$]	Úsek [nA]	R^2	L_Q [$\mu\text{mol l}^{-1}$]
10–100	$8,9 \pm 0,5$	42 ± 31	0,9869	-
1–10	$11,3 \pm 0,5$	14 ± 3	0,9928	-
0,1–1	$10,0 \pm 0,7$	$14,6 \pm 0,4$	0,9822	0,108



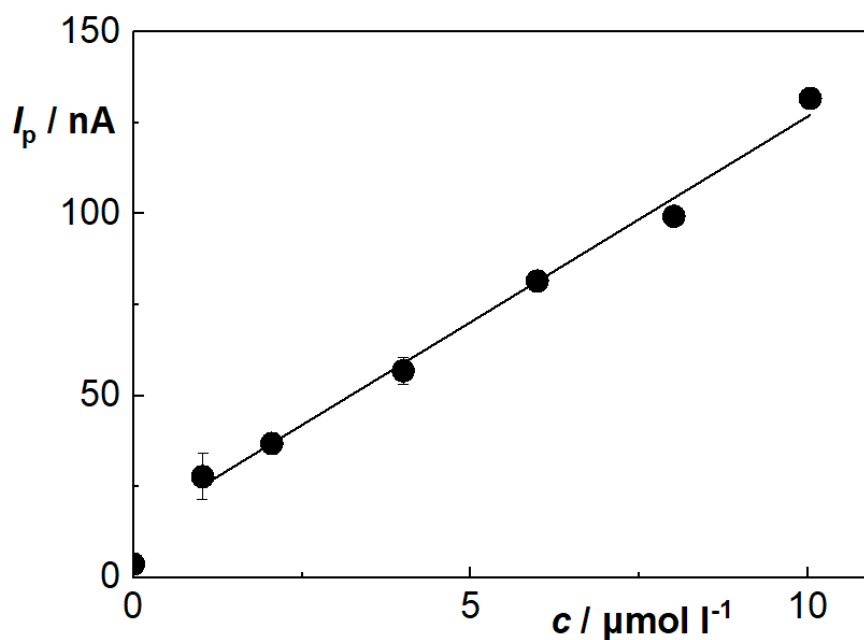
Obr. 15: Voltamogramy STZ v koncentračním řádu $c = 10\text{--}100 \mu\text{mol l}^{-1}$. Měřeno DPV na BDDE v prostředí BR pufu s $\text{pH} = 6,1$. Elektroda leštěna před sérií. Koncentrace jsou uvedeny vedle křivek.



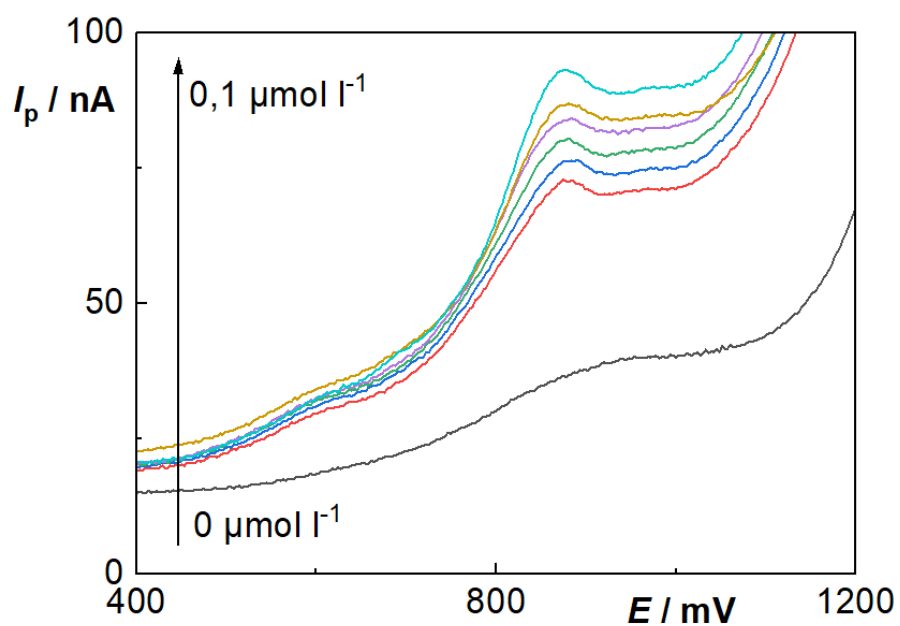
Obr. 16: Kalibrační závislost STZ v koncentračním řádu $c = 10\text{--}100 \mu\text{mol l}^{-1}$. Měřeno DPV na BDDE v prostředí BR pufu s $\text{pH} = 6,1$. Elektroda leštěna před sérií.



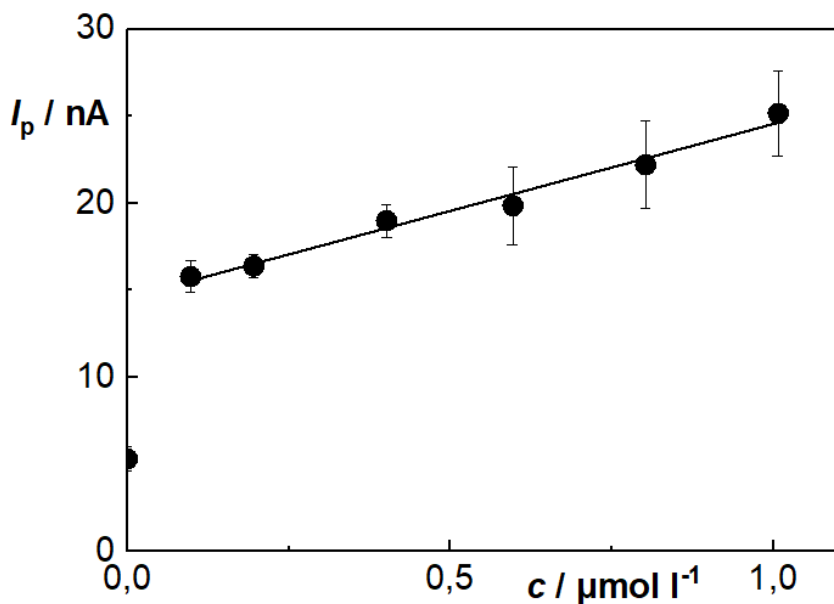
Obr. 17: Voltamogramy STZ v koncentračním řádu $c = 1\text{--}10 \mu\text{mol l}^{-1}$. Měřeno DPV na BDDE v prostředí BR pufru s $\text{pH} = 6,1$. Elektroda leštěna před každým měřením. Koncentrace jsou uvedeny vedle křivek.



Obr. 18: Kalibrační závislost STZ v koncentračním řádu $c = 1\text{--}10 \mu\text{mol l}^{-1}$. Měřeno DPV na BDDE v prostředí BR pufru s $\text{pH} = 6,1$. Elektroda leštěna před každým měřením.



Obr. 19: : Voltamogramy STZ v koncentračním řádu $c = 0,1 - 1 \mu\text{mol l}^{-1}$. Měřeno DPV na BDDE v prostředí BR pufu s $\text{pH} = 6,1$. Elektroda leštěna před každým měřením. Koncentrace jsou uvedeny vedle křivek.



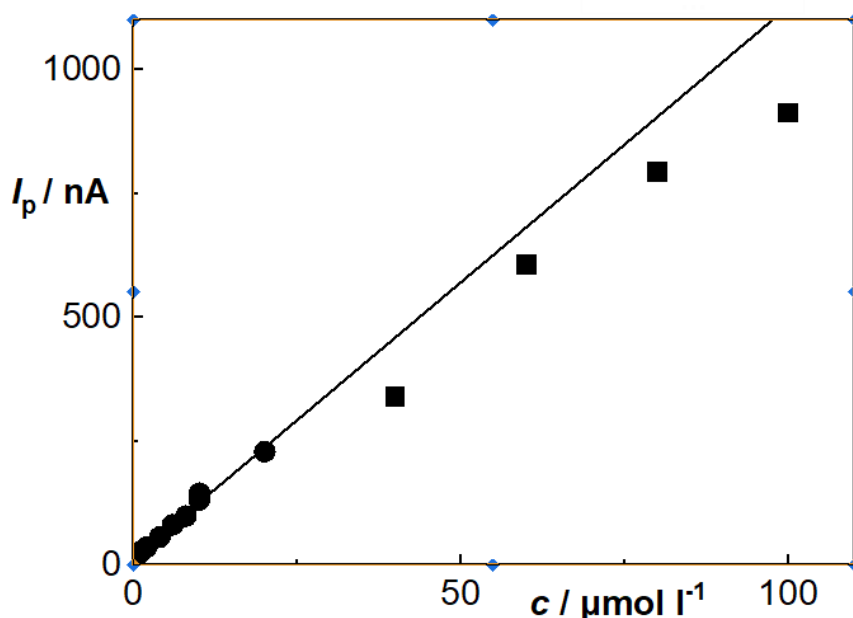
Obr. 20: Kalibrační závislost STZ v koncentračním řádu $c = 0,1 - 1 \mu\text{mol l}^{-1}$. Měřeno DPV na BDDE v prostředí BR pufu s $\text{pH} = 6,1$. Elektroda leštěna před každým měřením.

Měření v koncentračním rozsahu $0,1 - 1 \mu\text{mol l}^{-1}$ vykazovalo horší opakovatelnost. Pro dosažení, co možná nejlepších výsledků, bylo toto měření prováděno za specifických podmínek. Pro několik měření koncentrace $0,1$ a $0,2 \mu\text{mol l}^{-1}$ se píky překrývaly, tento problém byl eliminován 30 sekundovým promícháváním před každým měřením. U koncentrace $0,8$ a $1,0 \mu\text{mol l}^{-1}$ se několikrát měření odchýlili od linearitu a musela být opakována. To mohlo být způsobeno změnou pH při těchto měření z původních $6,0$ na $6,4$. K tomuto zvýšení došlo i v případě roztoku, ve kterém se analyt nenacházel. Kvůli eliminaci jakékoli vlivu nacházejícího se ve vzduchu bylo toto měření prováděno v inertní atmosféře dusíku a celá aparatura byla před měřením opláchnuta deionizovanou vodou. Další možnou příčinou bylo špatné promíchání roztoku při přípravě pufru o pH 6 .

Pro kalibrační závislosti byl spočítán lineární dynamický rozsah (LDR). Ten byl stanoven v rozmezí $0,1 - 20 \mu\text{mol l}^{-1}$. Z Obr. 21 je zřejmé, že vyšší hodnoty se od linearitu oddalují a závislost začíná postupně klesat. Tento výsledek je znehodnocen faktem, že koncentrační řád $10 - 100 \mu\text{mol l}^{-1}$ byl změřen s jinou předúpravou elektrody než zbylé řády, leštění probíhalo pouze před sérií, což může být důvodem jeho odklonu od linearitu. Pro koncentrační rozsah $0,1 - 20 \mu\text{mol l}^{-1}$ byla vytvořena přímka regrese, rovnice (7), která dosahovalo $R^2 = 0,9914$.

$$I_p [\text{nA}] = 11,1 \pm 3 [\text{nA} \cdot \text{l} \cdot \mu\text{mol}^{-1}] + 15 \pm 2 [\text{nA}] \quad (7)$$

Ze směrnice této regrese ($11,1 \text{ nA} \cdot \text{l} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$) a směrodatné odchylky ($0,108 \text{ nA}$) dosažené při měření opakovatelnosti při koncentraci $0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ byla spočítána mez stanovitelnosti $L_Q = 97 \text{ nmol l}^{-1}$ a mez detekce $L_D = 29 \text{ nmol l}^{-1}$.



Obr. 21: Kalibrační závislost STZ v koncentračním řádu $c = 0,1 - 100 \mu\text{mol l}^{-1}$. Měřeno DPV na BDDE v prostředí BR pufru s pH = $6,1$. Zobrazující odklon od linearitu u vyšších koncentrací.

5 ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce byly studovány elektrochemické vlastnosti sulfathiazolu (STZ) technikou diferenciální pulsní voltametrie (DPV) pomocí pracovní borem dopované diamantové elektrody (BDDE).

Při optimálních podmínkách, v prostředí Britton-Robinsonova pufru o pH 6 a s leštěním pracovní elektrody před každým měřením, byly získány kalibrační závislosti STZ v koncentračních řádech 0,1–1, 1–10 a ne zcela optimální, pracovní elektrody byla leštěna pouze před sérií, v rozmezí 10–100 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Byl spočítán lineární dynamický rozsah (LDR) pro koncentrace 0,1–20 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Z koncentračního rozsahu 0,1 až 20 $\mu\text{mol l}^{-1}$ byla spočtena mez stanovitelnosti $L_Q = 0,097 \mu\text{mol l}^{-1}$.

Při porovnání meze detekce dosaženého tímto stanovením $L_D = 0,029 \mu\text{mol l}^{-1}$ s jinými pracovními elektrodami dosahuje toto stanovení podobných limitů detekce. Pomocí elektrody ze skelného uhlíku (GCE) s modifikací $\text{Ti}_3\text{AlC}_2@\text{SmVO}_4$ (TASV) bylo za použití stejné metody dosaženo $L_D = 0,001 \mu\text{mol l}^{-1}$, cit.³⁶, a obdobnou metodou square weve voltametrie (SWV) pomocí GCE s modifikací poly(3-methylthiophen) (P3MT) $L_D = 0,064 \mu\text{mol l}^{-1}$, cit.³³.

Lepších výsledků ovšem dosahuje stanovení v porovnání s jinými SA stanovenými na BDDE, které mají obdobné elektrochemické vlastnosti. Metodou square weve voltametrie (SWV) bylo pomocí BDDE dosaženo $L_D = 2 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro sulfadiazin a $L_D = 1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro sulfamethoxazol²⁵.

6 Bibliografie

1. Domagk, G.: *Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen*. Deutsche Medizinische Wochenschrift, **1935**, 61(07), 250. DOI: [10.1055/s-0028-1129486](https://doi.org/10.1055/s-0028-1129486).
2. Souza, C. D.; Braga, O. C.; Vieira, I. C.; Spinelli, A.: *Electroanalytical Determination of Sulfadiazine and Sulfamethoxazole in Pharmaceuticals Using a Boron-Doped Diamond Electrode*. Sens Actuators B Chem **2008**, 135 (1), 66–73. DOI:[10.1016/J.SNB.2008.07.020](https://doi.org/10.1016/J.SNB.2008.07.020).
3. Henry, R. J.: *THE MODE OF ACTION OF SULFONAMIDES*. Bacteriol Rev **1943**, 7 (4), 175. DOI:[10.7326/0003-4819-119-7_PART_1-199310010-00005](https://doi.org/10.7326/0003-4819-119-7_PART_1-199310010-00005).
4. Carson, J. L.; Strom, B. L.; Duff, A.; Gupta, A.; Shaw, M.; Lundin, F. E.; Das, K.: *Acute Liver Disease Associated with Erythromycins, Sulfonamides, and Tetracyclines*. Ann Intern Med **1993**, 119 (7 I), 576–583. DOI:[10.7326/0003-4819-119-7_PART_1-199310010-00005](https://doi.org/10.7326/0003-4819-119-7_PART_1-199310010-00005).
5. Ohmachi, Y.; Toriumi, W.; Takashima, K.; Doi, K.: *Systemic Histopathology of Rats Treated with 6-Sulfanilamidindazole, a Novel Arthritogenic Sulfonamide*. Toxicologic Pathology **1998**, 26 (2), 262–270. DOI:[10.1177/019262339802600212](https://doi.org/10.1177/019262339802600212).
6. Gehring, T. A.; Griffin, B.; Williams, R.; Geiseker, C.; Rushing, L. G.; Siitonen, P. H.: *Multiresidue Determination of Sulfonamides in Edible Catfish, Shrimp and Salmon Tissues by High-Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Derivatization and Fluorescence Detection*. Journal of Chromatography B **2006**, 840 (2), 132–138. DOI:[10.1016/J.JCHROMB.2006.04.039](https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2006.04.039).
7. Keys, T. F.: *Antimicrobials Commonly Used for Urinary Tract Infection; Sulfonamides, Trimethoprim Sulfamethoxazole, Nitrofurantoin, Nalidixic Acid*. Mayo Clin Proc **1977**, 52 (11), 680–682.
8. Brown, J. P.; McGarraugh, G. V.; Parkinson, T. M.; Wingard, R. E.; Onderdonk, A. B. A.: *Polymeric Drug for Treatment of Inflammatory Bowel Disease*. J Med Chem **1983**, 26 (9), 1300–1307. DOI:[10.1021/JM00363a015](https://doi.org/10.1021/JM00363a015).
9. Won, S. Y.; Chandra, P.; Hee, T. S.; Shim, Y. B.: *Simultaneous Detection of Antibacterial Sulfonamides in a Microfluidic Device with Amperometry*. Biosens Bioelectron **2013**, 39 (1), 204–209. DOI:[10.1016/J.BIOS.2012.07.043](https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2012.07.043).
10. Barton, M. D.: *Antibiotic Use in Animal Feed and Its Impact on Human Health*. Nutr Res Rev **2000**, 13 (2), 279–299. DOI:[10.1079/095442200108729106](https://doi.org/10.1079/095442200108729106).
11. <https://www.theworldcounts.com/challenges/consumption/foods-and-beverages/antibiotics-used-for-livestock> (zobrazeno 17. 7. 2023).
12. Fang, G. Z.; He, J. X.; Wang, S.: *Multiwalled Carbon Nanotubes as Sorbent for On-Line Coupling of Solid-Phase Extraction to High-Performance Liquid Chromatography for Simultaneous Determination of 10 Sulfonamides in Eggs and Pork*. J Chromatogr A **2006**, 1127 (1–2), 12–17. DOI:[10.1016/J.CHROMA.2006.06.024](https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2006.06.024).
13. Kahle, M.; Stamm, C.: *Sorption of the Veterinary Antimicrobial Sulfathiazole to Organic Materials of Different Origin*. Environ Sci Technol **2007**, 41 (1), 132–138. DOI:[10.1021/ES061198B](https://doi.org/10.1021/ES061198B).
14. Kergoat, L.; Besse-Hoggan, P.; Leremboure, M.; Beguet, J.; Devers, M.; Martin-Laurent, F.; Masson, M.; Morin, S.; Roinat, A.; Pesce, S.; Bonnineau, C.: *Environmental Concentrations of Sulfonamides Can Alter Bacterial Structure and Induce Diatom Deformities in Freshwater Biofilm Communities*. Front Microbiol **2021**, 12, 643719. DOI:[10.3389/FMICB.2021.643719](https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.643719).

15. Cheong, M. S.; Seo, K. H.; Chohra, H.; Yoon, Y. E.; Choe, H.; Kantharaj, V.; Lee, Y. B.: *Influence of Sulfonamide Contamination Derived from Veterinary Antibiotics on Plant Growth and Development*. *Antibiotics* **2020**, *Vol. 9*, Page 456 **2020**, *9* (8), 456. DOI:[10.3390/ANTIBIOTICS9080456](https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9080456).
16. Goossens, J. F.; Thuru, X.; Bailly, C.: *Properties and Reactivity of the Folic Acid and Folate Photoproduct 6-Formylpterin*. *Free Radic Biol Med* **2021**, *171*, 1–10. DOI:[10.1016/J.FREERADBIOMED.2021.05.002](https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2021.05.002).
17. <https://www.nih.gov/news-events/nih-research-matters/how-sulfa-drugs-work> (zobrazeno 17. 7. 2023).
18. Bermingham, A.; Derrick, J. P.: *The Folic Acid Biosynthesis Pathway in Bacteria: Evaluation of Potential for Antibacterial Drug Discovery*. *BioEssays* **2002**, *24* (7), 637–648. DOI:[10.1002/BIES.10114](https://doi.org/10.1002/BIES.10114).
19. Bueno, A. M.; Contento, A. M.; Ríos, Á.: *Validation of a Screening Method for the Rapid Control of Sulfonamide Residues Based on Electrochemical Detection Using Multiwalled Carbon Nanotubes-Glassy Carbon Electrodes*. *Analytical Methods* **2013**, *5* (23), 6821–6829. DOI:[10.1039/C3AY41437J](https://doi.org/10.1039/C3AY41437J).
20. Granja, R. H. M. M.; Niño, A. M. M.; Rabone, F.; Salerno, A. G.: *A Reliable High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection for the Determination of Sulfonamides in Honey*. *Anal Chim Acta* **2008**, *613* (1), 116–119. DOI:[10.1016/J.ACA.2008.02.048](https://doi.org/10.1016/J.ACA.2008.02.048).
21. Díaz-Cruz, M. S.; García-Galán, M. J.; Barceló, D.: *Highly Sensitive Simultaneous Determination of Sulfonamide Antibiotics and One Metabolite in Environmental Waters by Liquid Chromatography–Quadrupole Linear Ion Trap–Mass Spectrometry*. *J Chromatogr A* **2008**, *1193* (1–2), 50–59. DOI:[10.1016/J.CHROMA.2008.03.029](https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2008.03.029).
22. Ait Lahcen, A.; Ait Errayess, S.; Amine, A.: *Voltammetric Determination of Sulfonamides Using Paste Electrodes Based on Various Carbon Nanomaterials*. *Microchimica Acta* **2016**, *183* (7), 2169–2176. DOI:[10.1007/S00604-016-1850-3](https://doi.org/10.1007/S00604-016-1850-3).
23. Braga, O. C.; Campestrini, I.; Vieira, I. C.; Spinelli, A.: *Sulfadiazine Determination in Pharmaceuticals by Electrochemical Reduction on a Glassy Carbon Electrode*. *J Braz Chem Soc* **2010**, *21* (5), 813–820. DOI:[10.1590/S0103-50532010000500008](https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000500008).
24. Msagati, T. A. M.; Ngila, J. C.: *Voltammetric Detection of Sulfonamides at a Poly(3-Methylthiophene) Electrode*. *Talanta* **2002**, *58* (3), 605–610. DOI:[10.1016/S0039-9140\(02\)00327-2](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00327-2).
25. Souza, C. D.; Braga, O. C.; Vieira, I. C.; Spinelli, A.: *Electroanalytical Determination of Sulfadiazine and Sulfamethoxazole in Pharmaceuticals Using a Boron-Doped Diamond Electrode*. *Sens Actuators B Chem* **2008**, *135* (1), 66–73. DOI:[10.1016/J.SNB.2008.07.020](https://doi.org/10.1016/J.SNB.2008.07.020).
26. Preechaworapun, A.; Chuanuwatanakul, S.; Einaga, Y.; Grudpan, K.; Motomizu, S.; Chailapakul, O.: *Electroanalysis of Sulfonamides by Flow Injection System/High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Amperometric Detection Using Boron-Doped Diamond Electrode*. *Talanta* **2006**, *68* (5), 1726–1731. DOI:[10.1016/J.TALANTA.2005.08.040](https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2005.08.040).
27. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/2028085> (zobrazeno 18. 7. 2023).
28. Voorhies, J. D.; Adams, R. N.: *Voltammetry at Solid Electrodes: Anodic Polarography of Sulfa Drugs*. *Anal Chem* **1958**, *30* (3), 346–350. DOI:[10.1021/AC60135A010](https://doi.org/10.1021/AC60135A010).

29. Goyal, R. N.; Kumar, A.; Miital, A.: *Electrochemical Oxidation of Sulphathiazole at Pyrolytic Graphite Electrode*. Indian J Chem **1989**, 28, 203–205.
30. Boreen, A. L.; Arnold, W. A.; McNeill, K.: *Photochemical Fate of Sulfa Drugs in Then Aquatic Environment: Sulfa Drugs Containing Five-Membered Heterocyclic Groups*. Environ Sci Technol **2004**, 38 (14), 3933–3940. DOI:[10.1021/ACS.CGD.1C00064](https://doi.org/10.1021/ACS.CGD.1C00064).
31. Takebayashi, Y.; Sue, K.; Furuya, T.; Yoda, S.: *Polymorphic Solubility Ratio of Famotidine and Sulfathiazole in Various Solvents*. Cryst Growth Des **2021**, 21 (5), 2868–2875. DOI:[10.1021/ACS.CGD.1C00064](https://doi.org/10.1021/ACS.CGD.1C00064).
32. Fogg, A. G.; Yusoff, A. R. H. M.; Moreira, J. C.; Zhao, R.: *Cathodic Stripping Voltammetric Determination of Sulfonamides as Copper(I) Complexes at a Hanging Mercury Drop Electrode*. Analytical Proceedings including Analytical Communications **1995**, 32 (3), 95–97. DOI:[10.1039/A19953200095](https://doi.org/10.1039/A19953200095).
33. Msagati, T. A. M.; Ngila, J. C.: *Voltammetric Detection of Sulfonamides at a Poly(3-Methylthiophene) Electrode*. Talanta **2002**, 58 (3), 605–610. DOI:[10.1016/S0039-9140\(02\)00327-2](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00327-2).
34. Chu, Q.; Zhang, D.; Wang, J.; Ye, J.: *Multi-Residue Analysis of Sulfonamides in Animal Tissues by Capillary Zone Electrophoresis with Electrochemical Detection*. J Sci Food Agric **2009**, 89 (14), 2498–2504. DOI:[10.1002/JSFA.3756](https://doi.org/10.1002/JSFA.3756).
35. Hung, C. M.; Chen, C. W.; Huang, C. P.; Dong, C. Di.: *Metal-Free Single Heteroatom (N, O, and B)-Doped Coconut-Shell Biochar for Enhancing the Degradation of Sulfathiazole Antibiotics by Peroxymonosulfate and Its Effects on Bacterial Community Dynamics*. Environmental Pollution **2022**, 311, 119984. DOI:[10.1016/J.ENVPOL.2022.119984](https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2022.119984).
36. Maheshwaran, S.; Balaji, R.; Chen, S. M.; Liao, Y. C.; Chandrasekar, N.; Ethiraj, S.; Samuel, M. S.: *Fabrication of 2D–0D Ti3AlC2@SmVO4 Heterojunction Nanocomposites for Ultrasensitive Electrochemical Detection of Sulfathiazole in Environmental Samples*. J Environ Chem Eng **2022**, 10 (6), 108956. DOI:[10.1016/J.JECE.2022.108956](https://doi.org/10.1016/J.JECE.2022.108956).
37. Kraft, A. *Doped Diamond: A Compact Review on a New, Versatile Electrode Material*. Int J Electrochem Sci **2007**, 2 (5), 355–385. DOI:[10.1016/S1452-3981\(23\)17080-5](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)17080-5).
38. Pleskov, Y. V.: *New Corrosion-Resistant Electrodes: Synthetic Diamond and Diamond-Based Materials. The Semiconductor and Structure Aspects-a Review*. Protection of Metals **2006**, 42 (2), 103–118. DOI:[10.1134/S0033173206020019](https://doi.org/10.1134/S0033173206020019).
39. Musilova, J.; Barek, J.; Peckova, K.: *The Use of Boron-Doped Diamond Film Electrodes for Detection of Organic Compounds*. Chemicke Listy **2009**, 103, 469.
40. Swain, G. M.; Anderson, A. B.; Angus, J. C.: *Applications of Diamond Thin Films in Electrochemistry*. MRS Bull **1998**, 23 (9), 56–60. DOI:[10.1557/S0883769400029389](https://doi.org/10.1557/S0883769400029389).
41. Panizza, M.; Cerisola, G.: *Application of Diamond Electrodes to Electrochemical Processes*. Electrochim Acta **2005**, 51 (2), 191–199. DOI:[10.1016/J.ELECTACTA.2005.04.023](https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2005.04.023).
42. Barek J.; Opekar F.; Štuhlík K.: *Elektroanalytická Chemie*. Karolinum. Praha **2005**. ISBN 8024611465.
43. Casella, I. G., Contursi, M., & Gioia, D.: *Development of a Liquid Chromatography/Amperometric Detection Method for the Determination of Multiresidue Sulfonamide Antibiotics in Meat-Based Baby Foods*. Electroanalysis, **2012**; 24(11), 2125–2133. DOI: [10.1002/ELAN.201200292](https://doi.org/10.1002/ELAN.201200292).

44. Ait Lahcen, A., Ait Errayess, S., & Amine, A.: *Voltammetric determination of sulfonamides using paste electrodes based on various carbon nanomaterials*. *Microchimica Acta*. **2016**; *183*(7), 2169–2176. DOI: [10.1007/S00604-016-1850-3](https://doi.org/10.1007/S00604-016-1850-3).
45. Gajdár, J. (2013).: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/57490> (zobrazeno 18. 7. 2023)
46. Meloun M. M. J.: *Statistické zpracování experimentálních dat na osobním počítači*. FINISH, Pardubice **1992**. ISBN: 80 7219 003 2.
47. Akay C, Özkan SA. *Simultaneous LC determination of trimethoprim and sulphamethoxazole in pharmaceutical formulations*. *J Pharm Biomed Anal*. **2002**; *30*(4):1207-1213. DOI:[10.1016/S0731-7085\(02\)00460-0](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00460-0).