

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Jana Ječmínková

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ CHLORAMFENIKOLU A  
OFLOXACINU  
NA BOREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODĚ

Voltammetric Determination of Chloramphenicol and Ofloxacin  
at Boron Doped Diamond Film Electrodes

Diplomová práce

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

Praha 2011

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumných záměru MSM0021620857 a rozvojového projektu RP14/63, z prostředků SVV-2010-263204, centra základního výzkumu LC 06035, projektu GAČR P206/10/P87.

## Prohlášení

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

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

V Praze dne 1. května 2011.

**Předmětová hesla:** chloramfenikol

ofloxacin

voltametrie

borem dopovaná diamantová filmová elektroda

extrakce tuhou fází

**Klíčová slova:** DC voltametrie

diferenční pulzní voltametrie

cyklická voltametrie

adsorpční rozpouštěcí voltametrie

**Abstrakt:**

Byly vypracovány voltametrické metody pro stanovení amfenikolového antibiotika Chloramfenikol (CAP) a chinoloného antibiotika Ofloxacin (OFL). Ke stanovení obou látek na borem dopované diamantové filmové elektrodě (BDDFE) byly použity techniky diferenční pulzní voltametrie (DPV) a DC voltametrie (DCV). Byl sledován vliv pH v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru a stálost signálu při opakovaných měření. Při stanovení CAP technikou DPV i DCV bylo optimální pH 6. Při stanovení OFL technikou DPV i DCV bylo optimální pH 4. Za těchto podmínek byly změřeny lineární kalibrační závislosti v koncentrační oblasti  $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Mez stanovitelnosti pro vyvinuté metody byla pro CAP technikou DPV  $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  a technikou DCV  $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  a pro OFL technikou DPV  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  a technikou DCV  $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ . Vyvinuté metody byly použity pro stanovení CAP ve vzorku léčiva Spersadex comp. a stanovení OFL ve vzorcích léčiva Zanocin 200. Byla vyvinuta metoda pro extrakci tuhou fází OFL z modelových i reálných vzorků moči s voltametrickou detekcí s mezí stanovitelnosti  $7 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ .

**Subject headings:** chloramphenicol

ofloxacin

voltammetry

boron doped diamond film electrode

solid phase extraction

**Key words:** DC voltammetry

Differential pulse voltammetry

Cyclic voltammetry

Adsorptive stripping voltammetry

**Abstract:**

Voltammetric methods for the determination amphenicol antibiotic chloramphenicol (CAP) and quinolone antibiotic Ofloxacin (OFL) were developed. Techniques differential pulse voltammetry (DPV) and DC voltammetry (DCV) for determination of both substances at boron doped diamond film electrode (BDDFE) were used. The effect of pH of Britton-Robinson buffer was tested and the stability of the signal with repeated measurements was monitored. Optimal pH 6 was used for determining of CAP by both, DPV and DCV techniques. Media of pH 4 for determining of OFL by DPV and DCV was optimal. Under these conditions linear dependences in the calibration concentration region  $1 \cdot 10^{-6}$  -  $1 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> were obtained. The limit of determination for the method for CAP by DPV at  $3 \cdot 10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup>, by DCV at  $3 \cdot 10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> and for OFL by DPV at  $1 \cdot 10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> and by DCV at  $4 \cdot 10^{-7}$  mol.l<sup>-1</sup> was found. The developed methods were used for the determination of CAP in the drug samples Spersadex comp. and OFL determination in drug samples Zanocin 200. Method for solid phase extraction of OFL from samples of urine with voltammetric detection was developed with limit of determination at  $7 \cdot 10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup>.

Úvodem bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Fischerovi, Ph.D. a všem členům Katedry analytické chemie za odborné vedení, všestrannou pomoc a cenné připomínky k mé práci.

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	9
1.1 Cíl práce .....	9
1.2 Studované látky .....	10
1.2.1 Chloramfenikol.....	10
1.2.1.1 Vlastnosti a biologické účinky chloramfenikolu .....	10
1.2.1.2 Metody stanovení chloramfenikolu.....	11
1.2.2 Ofloxacin .....	16
1.2.2.1 Vlastnosti a biologické účinky ofloxacinu .....	17
1.2.2.2 Metody stanovení ofloxacinu .....	18
1.3 Použité elektrody .....	19
<b>2. Experimentální část</b> .....	21
2.1 Reagencie .....	21
2.2 Aparatura .....	21
2.3 Pracovní postupy .....	23
2.3.1. Voltametrie .....	23
2.3.2 Stálost zásobních roztoků .....	25
2.3.2.1 Chloramfenikol .....	25
2.3.1.2 Ofloxacin .....	26
<b>3. Výsledky a diskuse</b> .....	28
3.1 Stanovení chloramfenikolu ve vzorku léčiva.....	28
3.2 Voltametrické stanovení ofloxacinu .....	31
3.2.DC voltametrie .....	31
3.2.2 Diferenční pulzní voltametrie .....	36
3.2.3. Adsorpční rozpouštěcí voltametrie .....	41
3.2.4 Cyklická voltametrie .....	43
3.3 Stanovení ofloxacinu ve vzorku léčiva .....	48

3.5 Extrakčně-voltametrické stanovení ofloxacinu .....	51
3.5.1 Stanovení ofloxacinu DC voltametrií po extrakci.....	53
3.5.1.2 Voltametrické stanovení ofloxacinu v lidské moči po SPE.....	54
<b>4. Závěr .....</b>	<b>57</b>
<b>5. Literatura .....</b>	<b>69</b>

## Seznam použitých zkratek a symbolů

A	absorbance
AdSV	adsorpční rozpouštěcí voltametrie
BDDFE	borem dopovaná diamantová filmová elektroda
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
$c$	molární koncentrace [ $\text{mol.l}^{-1}$ ]
CAP	chloramfenikol
CV	cyklická voltametrie
DCV	DC voltametrie
DPV	diferenční pulzní voltametrie
$E_{\text{acc}}$	potenciál akumulace
$E_p$	potenciál píku [mV]
$E_{1/2}$	půlvlnový potenciál [mV]
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
$I_p$	proud píku [nA]
$I_v$	proud vlny [nA]
LOQ	mez stanovitelnosti [ $\text{mol.l}^{-1}$ ]
OFL	ofloxacin (pouze S izomer Levofloxacin)
$p_a$	anodický pík
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
$p_k$	katodický pík
SPE	extrakce tuhou fází
$t$	čas [s]
$t_{\text{acc}}$	doba akumulace
$\lambda_{\text{max}}$	vlnová délka absorpčního maxima [nm]



# 1. Úvod

## 1.1 Cíl práce

Cílem této práce bylo nalézt optimální podmínky pro stanovení chloramfenikolu a ofloxacinu v léčivech, v modelových i v reálných vzorcích na borem dopované diamantové filmové elektrodě technikou DC voltametrie a diferenční pulzní voltametrie s co nejnižší mezí stanovitelnosti.

## 1.2 Studované látky

### 1.2.1 Chloramfenikol

Systematický název: 2,2-dichlor-N-[(1R, 2R)-2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-2-(4-nitrofenyl)ethyl]acetamid

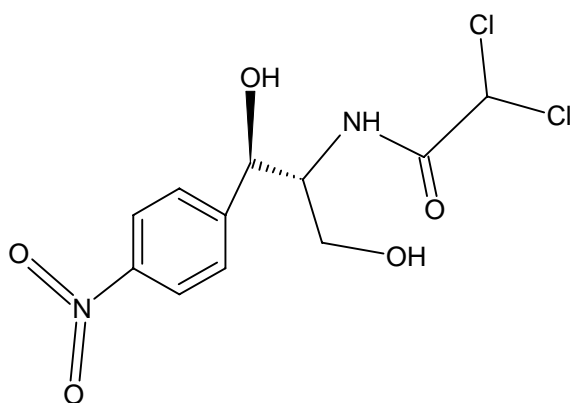
CAS Name: Chloramphenicol

Další názvy: Amphenicol, Chloramex, Chlorocid, Chloromycetin, Chloronitrin, Fenicol; Leukomycin, Levomicetina, Loromisin, Mastiphe, Mycinol, Novomycetin

Sumární vzorec:  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$

Relativní molekulová hmotnost: 323,12

CAS registrační číslo: 56-75-7



**Obr. 1.1** *Strukturní vzorec CAP*

#### 1.2.1.1 Vlastnosti a biologické účinky chloramfenikolu

Chloramfenikol (CAP) je bílý, naředěný bílý nebo nažloutle bílý jemný krystalický prášek nebo jemné krystalky. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v 96% ethanolu a v propylenglykolu.<sup>1</sup>

CAP patří do skupiny amfenikolových antibiotik. Je to širokospektrální antibiotikum, působící proti většině gram-pozitivním i gram-negativním a většině anaerobním bakteriím.<sup>2</sup>

Byl izolován v roce 1947 ze *Streptomyces venezulae* Davidem Gottliebem. U některých indikací patřil CAP k nejspolehlivějším antibiotikům již od konce 40. let. Je běžně používán k léčbě závažných infekcí, jako například břišního tyfu, dalších forem salmonelózy a dětské meningitidy. Působí proti *Nisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus*

influenzae a *Enterococcus faecium*.<sup>3</sup> Chloramfenikol je mimořádně rozpustný v lipidech, proto účinně proniká do všech tkání v těle, včetně mozku. Má bakteriostatický účinek.<sup>4</sup> Výrazně inhibuje bakteriální proteosyntézu a inhibuje transpeptidační reakce, ke kterým dochází na akceptorovém místě rRNA. Po odstranění antibiotika se syntéza peptidů z aminokyselin rychle obnovuje. Při prodloužené expozici může dojít k degradaci ribosomů, exkreci buněčných makromolekul a lýzi.<sup>3</sup>

Vzhledem k nízkým nákladům na výrobu a vysoké účinnosti je také hojně používán v živočišné výrobě a je široce využíván ve veterinární praxi jako doplňková látka pro podporu růstu.<sup>5</sup> Nicméně to, že je relativně vysoká úroveň rezidua antibiotika v potravinách může vyvolávat alergické reakce u některých přecitlivělých jedinců a může ohrozit lidský imunitní systém.<sup>6</sup> Nedávný výzkum ukázal, že CAP má toxické nežádoucí účinky na krvetvorný systém. Nejčastějším účinkem je aplastická anémie (neschopnost kostní dřeně produkovat krvinky). Proto jsou dnes jeho klinické aplikace omezeny.<sup>4</sup> Pro použití v potravinách živočišného původu byl zakázán na území celé Evropské unie a Spojených států amerických.<sup>7</sup> Avšak v rozvojových zemích je stále velmi široce používán.<sup>4</sup>

Dnes je CAP předepisován v širokém rozsahu především ve formě očních kapek nebo mastí k léčbě konjunktivitid (zánětu spojivek). Aplikace ve formě tablet nebo injekcí s sebou nese riziko aplastické anémie. Působí tlumivě na krvetvorbu a snižuje tvorbu protilátek, proto by se měl užívat pouze k léčbě nejtěžších infekcí, které jsou rezistentní vůči bezpečnějším typům antibiotik.<sup>8</sup>

### **1.2.1.2 Metody stanovení Chloramfenikolu**

Výběr analytické metody pro stanovení CAP závisí na biologické matrici a předpokládané koncentraci analytu ve vzorku. Pro stanovení této látky již byla vyvinuta řada technik.

Mezi ně patří například: UV spektrometrie<sup>9</sup>, plynová<sup>10</sup> či kapalinová chromatografie<sup>11, 12</sup>, HPLC<sup>5, 13</sup> nebo kapilární zónové elektroforéza s amperometrickou detekcí.<sup>14</sup> V praxi jsou asi nejvíce využívané spojení kapalinové nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.<sup>5, 11</sup>

Nicméně některé tyto metody jsou často komplikované a časově a finančně náročné. Proto je v posledních letech tendence nahradit je jinými levnějšími, jednoduššími a méně náročnými metodami. Tyto požadavky by mohly splnit vysoce citlivé elektroanalytické metody.<sup>15, 16</sup>

### 1.2.1.2.1 Spektrometrické metody

Chloramfenikol lze stanovit buď přímo měřením absorpance v ultrafialové oblasti, nebo také po dostatečné úpravě ve viditelné oblasti spektra. Spektrometrické metody se nejčastěji využívají při stanoveních v léčivech. Při měření v ultrafialové oblasti se většinou využívá měření celého absorpčního spektra, které je vhodné pro stanovení složitých směsí analytů. Navíc mnohdy není ani potřeba před samotnou analýzou použít dělicích technik. Avšak tato stanovení mohou velmi rušit pomocné látky v léčivech, které silně překrývají píky analytů. Touto metodou byl CAP stanoven s detekčním limitem  $7,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ .<sup>9</sup> Při stanovení ve viditelné oblasti se využívá redukce zinkem a následné diazotace, přičemž se vytvoří barevný chromogen, jehož koncentrace se následně měří.<sup>17</sup> Výhodou spektrofotometrických stanovení je jednoduchost a snadná dostupnost instrumentace. Nevýhodou však je malá selektivita metod a poměrně dráhá pořizovací cena přístrojů.

### 1.2.1.2.2 Separační metody

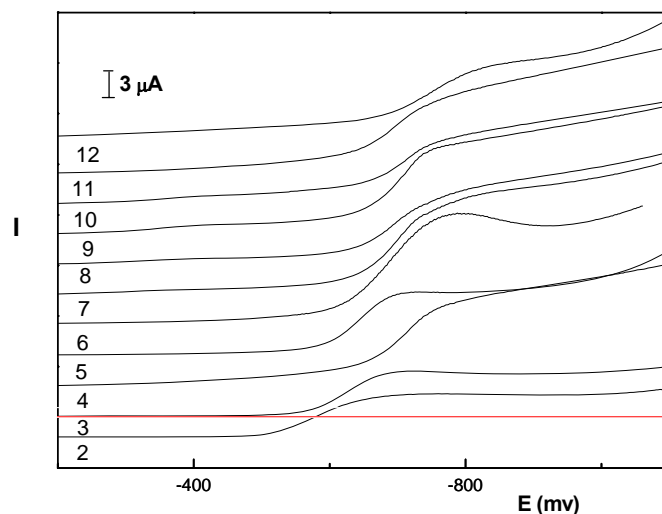
Chloramfenikol se asi nejčastěji stanovuje právě pomocí chromatografických metod. Mezi používané patří kapalinová i plynová chromatografie. CAP byl stanoven metodou plynové chromatografie na reverzní fázi s mobilní fází methanol/acetonitril s hmotnostní detekcí. Byla zde použita SPE na kolonce obsahující C18 a toto stanovení CAP v různých matricích mělo limit detekce  $8 \cdot 10^{-10} \text{ mol.l}^{-1}$ , kdy bez předběžné extrakce byl limit detekce  $1,6 \cdot 10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$ .<sup>10</sup> Dále byl stanoven kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Nejdříve ve vzorcích potravin s limitem detekce  $2 \cdot 10^{-10} \text{ mol.l}^{-1}$ <sup>11</sup> a poté v krmivech pro zvířata s limitem detekce  $5 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$ .<sup>12</sup> Metodou HPLC-DAD (diod array detektor) byl stanoven CAP v mléce po předchozí extrakci na C18 koloně, kdy byl limit detekce s předchozí SPE  $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$  a bez SPE  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ .<sup>13</sup> Při stanovení CAP v krmivech pro zvířata metodou HPLC s UV detekcí bylo dosaženo detekčního limitu  $3 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$ .<sup>5</sup> CAP byl také stanoven pomocí UPLC (Ultra performance liquid chromatography) ve vzorcích mléka také po předchozí extrakci pomocí DAD detektoru. Limit detekce byl  $6 \cdot 10^{-11} \text{ mol.l}^{-1}$ .<sup>18</sup> Dále byl stanoven také pomocí kapilární zónové elektroforézy s amperometrickou detekcí s limitem detekce  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ .<sup>14</sup> Chromatografické metody jsou s oblibou používány vzhledem k jejich mimořádné selektivě, citlivosti a vhodnosti pro sériové analýzy. K jejich nevýhodám patří vysoká pořizovací a provozní cena spojená s velkou spotřebou těkavých a poměrně drahých organických rozpouštědel.

### 1.2.1.2.3 Elektroanalytické metody

Chloramfenikol je snadno redukovatelná látka, a proto může být voltametriky či polarograficky stanoven na vhodné pevné, pastové nebo rtuťové elektrodě.

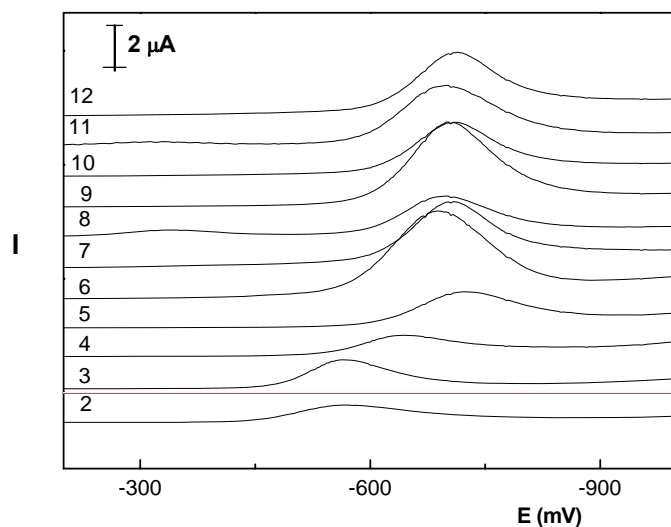
Elektrochemické vlastnosti CAP byly již mnohokrát studovány. Chloramfenikol byl stanoven na elektrodách ze skelného uhlíku. Nejdříve diferenční pulzní voltametrií ve fosfátovém pufru (pH 7,0), kde bylo dosaženo detekčního limitu asi  $5 \cdot 10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$ .<sup>4</sup> a poté cyklickou a square-wave voltametrií v acetátovém pufru o pH 5,3 s detekčním limitem  $6 \cdot 10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$ .<sup>19</sup> CAP byl také zkoumán square-wave polarografií na rtuťové kapkové elektrodě, kde byl detekční limit  $10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$ .<sup>20</sup> Square-wave voltametrií byl CAP dále zkoumán na mikroelektrodách z uhlíkových vláken v prostředí fosfátového pufru o pH 7,8 a limitem detekce  $4,7 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$ .<sup>7</sup>

Na borem dopované diamantové filmové elektrodě byl již také studován cyklickou voltametrií. U této metody byl nejvyšší signál CAP získán s fosfátovým pufrům (pH 6) v 1% etanolu a limit detekce  $3 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$ . Tato metoda byla použita ke stanovení chloramfenikolu ve sterilních očních kapkách, vzorku mléka.<sup>21</sup> Tato práce byla dále rozvinuta bakalářskou prací,<sup>22</sup> ve které byl CAP stanoven pomocí BDDFE. CAP byl stanoven metodou DPV i DCV a byla provedena i cyklická voltametrie. U DCV byl sledován vliv pH (viz. Obr. 1.2) a následně byly proměřeny koncentrační závislosti CAP v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-4}$ –  $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  v prostředí BR pufru o pH 6, kde CAP poskytoval nejvyšší signál. Touto metodou bylo pro CAP dosaženo meze stanovitelnosti  $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ .



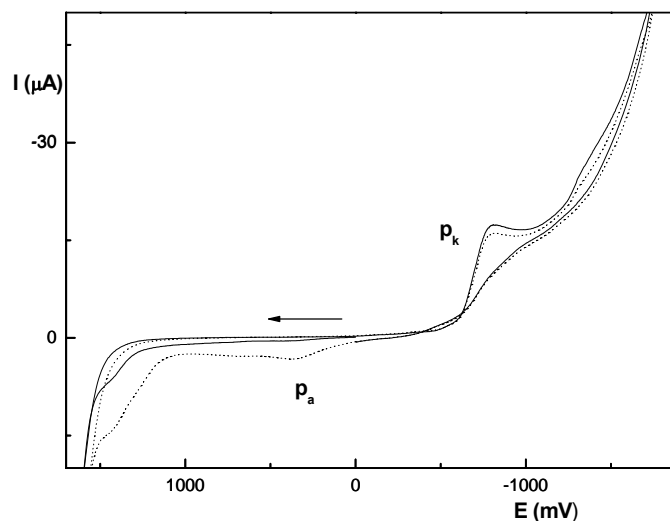
**Obr. 1.2** Voltamogramy CAP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) měřené technikou DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 2–12 . Čísla v grafu odpovídají použitému pH.<sup>22</sup>

U DPV byl sledován vliv pH (viz. Obr. 1.3) a následně byly proměřeny koncentrační závislosti CAP v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  v prostředí BR pufru o pH 6, kde poskytoval nejvyšší signál. Touto metodou bylo pro CAP dosaženo meze stanovitelnosti  $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ .



**Obr. 1.3** Voltamogramy CAP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) měřené technikou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 2–12. Čísla uvedená v grafu odpovídají pH.<sup>22</sup>

Metodou cyklické voltametrie byly v roztoku CAP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  v prostředí BR pufru o pH 6 měřeny tři cykly od 0 mV v potenciálovém rozsahu od 1550 do  $-1770 \text{ mV}$  (viz Obr. 1.4). Při prvním cyklu se objevil jeden pík při potenciálu  $-780 \text{ mV}$ . Při druhém cyklu se objevily dva píky při  $p_k$  ( $-780 \text{ mV}$ ) a  $p_a$  ( $400 \text{ mV}$ ). V třetím cyklu se oba píky už jen snížily. Katodický pík při potenciálu  $p_k$  ( $-780 \text{ mV}$ ) odpovídá redukci nitro skupiny na hydroxylaminovou skupinu. Anodický pík při potenciálu  $p_a$  ( $400 \text{ mV}$ ) odpovídá oxidaci hydroxylaminové skupiny na nitroso skupinu.



**Obr. 1.4** Voltamogram CAP ( $c=1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) měřené technikou CV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 6 při obou cyklech. Měřeno ve směru od 0 mV k 1550 mV poté k -1770 mV a k 0 mV. První cyklus- plná čára; druhý cyklus-tečkovaná čára. <sup>22</sup>

### 1.2.2 Ofloxacin

Systematický název: Kyselina (RS)-9-fluor-3-methyl-10-(4-methylpiperazin-1-yl)-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]benzoxazin-6-karboxylová

CAS Name: Ofloxacinum

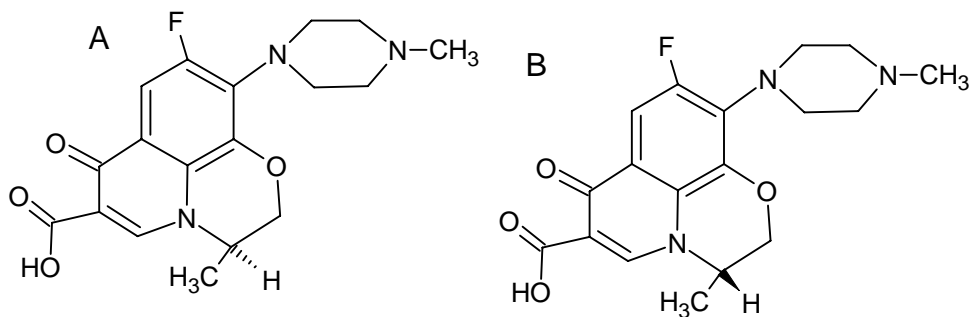
Další názvy: Floxin, floxacin, levofloxacin

Sumární vzorec:  $C_{18}H_{20}FN_3O_4$

Relativní molekulová hmotnost: 361,37

CAS registrační číslo: 83380-47-6





**Obr. 1.4** *Strukturní vzorec OFL. (A) S izomer Levofloxacin; (B)R izomer*

### 1.2.2.1 Vlastnosti a biologické účinky ofloxacinu

Bledě nebo jasně žlutý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v kyselině octové ledové, těžce rozpustný v methanolu.<sup>1</sup>

Ofloxacin tvoří racemickou směs, kde je poměr mezi pravotočivou a levotočivou složkou 1:1. Jeho aktivní formou je S izomer, který je známý pod názvem levofloxacin. Obě látky mají obdobné účinky, avšak levofloxacin je dvojnásobně účinnější.<sup>23</sup>

Je to širokospektrý baktericidní derivát třetí generace chinolonové řady.<sup>24</sup> Antibiotikum bylo připraveno a zavedeno do praxe v roce 1981. Jde o velmi málo toxický a dobře snášený preparát. V těle se nemetabolizuje a má výbornou tkáňovou distribuci. Chinolonová antibiotika, mezi která patří námi studovaný OFL všeobecně působí na bakteriální syntézu proteinů. Při nízkých koncentracích blokuje replikaci DNA a při vyšších její transkripci. Účinek antibiotika je velmi komplexní. Výhodou ofloxacinu je jeho velmi účinná aplikace a malá toxicita.<sup>3</sup> Působí zejména proti gram-negativním i gram-pozitivním bakteriím.<sup>23, 24</sup> Používá se při terapii dýchacích infekcí, infekcí močového systému.<sup>25</sup> Díky silné účinnosti a výborné distribuci dosahuje léčebných úspěchů při kapavce, prostatitidě různé etiologie a u chlamydiových infekcí. U raných infekcí je ofloxacin výrazně účinnější než tetracykliny či chloramfenikol.<sup>3</sup> Dále se používá k léčbě chronické osteomyelitidy, infekcí gastrointestinálního ústrojí a žlučových cest.<sup>25</sup> Byl také používán jako antibiotikum druhé volby při léčbě tuberkulózy.<sup>26</sup>

### 1.2.2.2 Metody stanovení ofloxacinu

Výběr analytické metody pro stanovení ofloxacinu závisí na biologické matici a předpokládané koncentraci analytu ve vzorku. Pro stanovení ofloxacinu již byla vyvinuta řada technik.

Mezi ně patří například: UV/VIS a fluorescenční spektrometrie<sup>27,28</sup>, kapalinová chromatografie<sup>23</sup>, HPLC<sup>25, 29</sup>, kapilární elektroforéza<sup>30</sup> nebo elektroanalytické metody.<sup>31-33</sup> V praxi je asi nejvíce využívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní či fluorimetrickou detekcí.<sup>23,25</sup>

Nicméně některé tyto metody jsou často komplikované a časově a finančně náročné. Proto je v posledních letech tendence nahradit je jinými levnějšími, jednoduššími a méně náročnými metodami. Tyto požadavky by mohly splnit vysoce citlivé elektroanalytické metody.<sup>15, 16</sup>

#### 1.2.2.2.1 Spektrometrické metody

Ofloxacin lze stanovit vzhledem k jeho nažloutlé barvě přímo měřením absorpance ve viditelné oblasti spektra s limitem detekce  $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ .<sup>27</sup> Dále se pak využívá jeho schopnosti tvořit s některými kationty kovů ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) barevné komplexy<sup>24</sup>, nebo jeho schopnosti fluoreskovat, kde byl limit detekce  $6,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ .<sup>28</sup>

#### 1.2.2.2.2 Separační metody

Mezi nejčastěji používané techniky stanovení chinolinů patří HPLC v kombinaci s fluorescenční, UV, nebo hmotnostní detekcí. Metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí, ale i s MS detekcí byl ofloxacin stanoven v odpadních vodách. Stacionární fází byl Zorbax SB-C8 a byla použita metoda izokratické eluce. Před analýzou vzorku byla ještě použita SPE s kolonkou C18. Limit detekce u této metody byl  $5,5 \cdot 10^{-12} \text{ mol.l}^{-1}$  s extrakcí a bez extrakce  $1,4 \cdot 10^{-10} \text{ mol.l}^{-1}$ .<sup>23</sup> Dále byl OFL stanoven v krvi pomocí HPLC na reverzní fází s fluorescenční detekcí s limitem detekce  $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ .<sup>25</sup> Byl také stanoven v tabletách kapalinovou chromatografií na reverzní fází za pomoci UV-VIS, fluorimetrického a DAD detektoru. Limit detekce byl  $5,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$ .<sup>29</sup> Dále byl stanoven kapilární zónovou elektroforézou s fluorescenční detekcí s limitem detekce  $6,6 \cdot 10^{-10} \text{ mol.l}^{-1}$ .<sup>30</sup>

### 1.2.2.3 Elektroanalytické metody

Ofloxacin je snadno oxidovatelná i redukovatelná látka, a proto může být voltametricky či polarograficky stanoven na řadě elektrod.

Elektrochemické vlastnosti ofloxacinu byly již mnohokrát studovány. V prvních studiích byly chinolonové deriváty včetně OFL stanovovány pomocí DC polarografie a diferenční pulsní polarografie.<sup>32</sup> Chinolonové deriváty byly také studovány adsorpční katodickou rozpouštěcí voltametrií, kde byl nejdříve vytvořen komplex s měďnatými ionty a poté byl tento komplex stanoven square wave voltametrií na rtuťové kapkové elektrodě, kde byl detekční limit  $3,3 \cdot 10^{-10}$  mol.l<sup>-1</sup>.<sup>31, 33</sup> Dále byl ofloxacin stanovován na elektrodách ze skelného uhlíku. V obou případech se zabývali píkem vzniklým oxidací ofloxacinu. V prvním případě byl detekční limit byl  $1 \cdot 10^{-7}$  mol.l<sup>-1</sup> a tato metoda byla úspěšně použita pro stanovení ofloxacinu v léčivech<sup>33</sup> a v druhém případě byl detekční limit  $9 \cdot 10^{-9}$  mol.l<sup>-1</sup>.<sup>34</sup>

### 1.3 Použité elektrody

Jako pracovní elektrody se ve voltametricky či polarografii až do nedávné doby asi nejvíce využívaly rtuťové kapkové elektrody. Avšak s ohledem na přísná ekologická a bezpečnostní pravidla, která komplikují používání rtuti, je tendence nahradit ji jinými nejedovatými materiály.<sup>35</sup> Dále se běžně používají elektrody ze skelného uhlíku,<sup>36</sup> uhlíkové pastové elektrody<sup>37</sup> a netradiční elektrody. Mezi které patří například tuhé amalgamové stříbrné elektrody<sup>38</sup> a námi používaná borem dopovaná diamantová elektroda.<sup>15</sup>

Výběr elektrody závisí na tom, jestli má stanovovaná látka elektrochemicky redukovatelnou nebo oxidovatelnou funkční skupinu. Borem dopovaná diamantová elektroda je však vhodná pro obě stanovované látky, a proto byla zvolena pro použití v této práci.

Námi stanovovaná látka chloramfenikol obsahuje snadno redukovatelnou funkční skupinu -NO<sub>2</sub>. Při stanovení CAP dochází nejprve ke čtyřelektronové redukci nitroskupiny na hydroxylaminovou skupinu, která je pak při cyklické voltametricky zpětně oxidovatelná až při vyšších kladných potenciálech na nitroso skupinu.<sup>39</sup> Ofloxacin je snadno oxidovatelný i redukovatelný. Katodický pík odpovídá redukci oxoskupin na hydroxylové skupiny a anodický pík odpovídá oxidaci 4-methylpiperazin-1-yllové skupiny, která se chová jako aminová skupina.<sup>40</sup>

Diamant představuje svými vynikajícími vlastnostmi materiál atraktivní pro mnoho aplikací jako elektronická zařízení, vysokoteplotní čidla, biomedicínské aplikace a pro přípravu

velmi stabilní elektrody pro elektrochemii,<sup>41-43</sup> a je také jeden z nejlepších izolantů, ale při jeho dopování borem můžeme upravovat jeho elektrické vlastnosti v závislosti na dopované úrovni.<sup>44</sup>

První práce zabývající se využitím polovodiivých diamantových elektrod v elektrochemii byla publikována v roce 1987.<sup>45</sup> Velmi často jsou využívány borem dopované diamantové elektrody ve formě polykrystalických filmů, které se připravují metodou chemické depozice par. Jako zdroje energie se zde využívá žhavených vláken nebo mikrovlnného ohřevu. Do reaktoru je přiváděna směs methanu, vodíku a diboranu. Methan slouží jako zdroj uhlíku k růstu diamantu, vodík jako redukční prostředí a diboran jako zdroj boru pro dopaci diamantu. Nosičem jsou zde křemíkové destičky. Tyto destičky mají nízký odpor a jsou zabroušeny diamantovým prachem – částičky tohoto prachu slouží poté jako krystalizační centra. Během výroby se mohou upravovat některé parametry jako například teplota, tlak, rychlost průtoku plynů nebo doba růstu diamantu. Podle těchto parametrů můžeme připravit BDDFE v různých formách – od mikrokrystalické až po ultrananokrystalickou. Tyto formy se liší tloušťkou vrstvy a velikostí zrn.<sup>46, 47</sup>

Borem dopované diamantové elektrody se hodně využívají pro své výborné elektrochemické vlastnosti jako například široké potenciálové okno, nízká kapacita elektrické dvojvrstvy,<sup>42, 48, 49</sup> jejímž důsledkem je nízký zbytkový proud a velmi malý šum.<sup>50</sup> Mezi další vlastnosti patří nízká adsorpce polárních organických molekul, vysoká odolnost k deaktivaci,<sup>42, 43</sup> snadné čištění povrchu ve srovnání s jinými elektrodovými povrchy, vysoká citlivost, chemická netečnost, bezpečnější provozní podmínky.<sup>15, 16, 46</sup>

## 2. Experimentální část

### 2.1 Reagencie

Zásobní roztoky chloramfenikolu a levofloxacinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  byly připraveny rozpuštěním přesně naváženého množství dané látky (99%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR) ve 100 ml destilované vody. Roztoky o nižších molaritách byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku destilovanou vodou. Všechny roztoky byly uchovávány ve tmě za laboratorní teploty.

Vzorky léčiv: Spersadex Comp. (oční kapky, roztok, 5 ml, Novartis Česká Republika, šarže: 417588, složení: Chloramphenicolum 5mg a dexamethasoni natrii phosphas 1mg v ml roztoku, benzalkonium-chlorid, makrogol 400, glycerolmakrogolricinoleát, dinatrium-edlát, roztok hydroxidu sodného, voda na injekce), Zanocin 200mg (10 potahovaných tablet, Ranbaxy Velká Británie, šarže: 1981298, složení: ofloxacinum 200mg, laktosa, mikrokrystalická celulóza, sodná sůl karboxymethylškrobu, kukuřičný škrob, koloidní bezvodý oxid křemičitý, mastek, magnesium-stearát, hydrolosa, polysorbát 80, hypromelosa 2506/5, makrogol 400, oxid titaničitý)

Další použité chemikálie – kyselina dusičná, octová kyselina, kyselina fosforečná, hydroxid sodný (Penta Chrudim, ČR) chlorid draselný (Lachner Neratovice, ČR), kyselina boritá, hexakynoželesnatan draselný (ferrokyanid) (Lachema Brno, ČR) – čistota p.a..

Brittonovy-Robinsonovy (BR) tlumivé roztoky o příslušném pH byly připraveny smíšením  $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$  NaOH s roztokem obsahujícím kyselinu boritou, fosforečnou a octovou, každou o koncentraci  $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ .

Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem Jenway 4330 (Jenway, Essen, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005). pH-metr byl kalibrován standardními vodnými pufrů za laboratorní teploty.

Extrakce tuhou fází: Byly použity SPE kolonky Lichrolut RP-18E (40-63  $\mu\text{m}$ ), katalogové číslo K91352647 (Merck, Darmstadt, Německo).

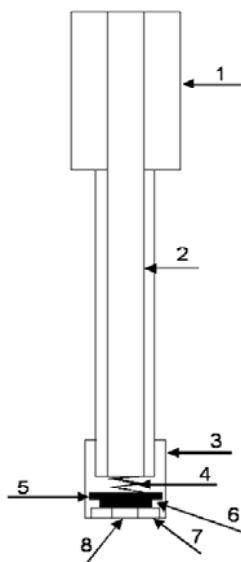
### 2.2 Aparatura

Pro voltametrická měření byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 5.1, firma Polaro-Sensors, Praha, ČR. Software pracoval v operačním systému Windows

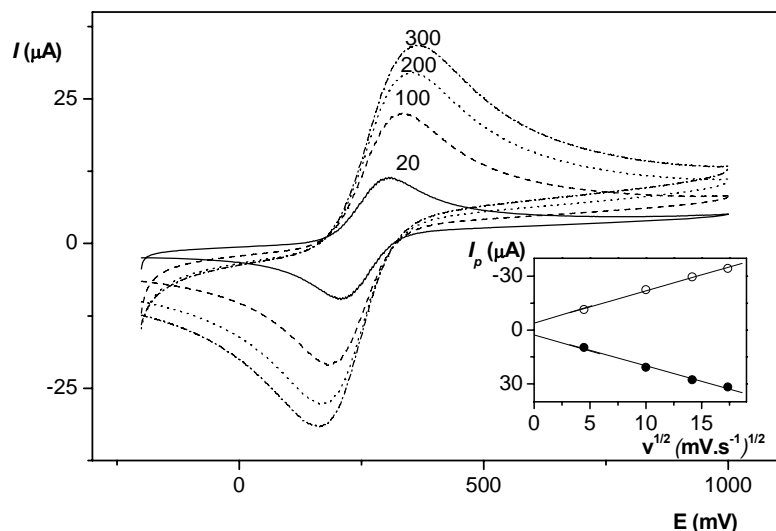
XP. Jednotlivá měření byla prováděna v tříelektrodevém zapojení, kde byla použita referentní argentchloridová elektroda ( $3 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KCl}$ ) typu ETP – CZ – R01008 a jako pomocná elektroda platinový drátek typu ETP – CZ P00208 (oboje Eco Trend Plus, Praha). Jako pracovní elektroda byla použita borem dopovaná diamantová filmová elektroda (BDDFE) v diskovém uspořádání (viz obr. 2.1) o průměru 4 mm. Při cyklické, DP a DC voltametrii byla rychlost nárůstu potenciálu  $20 \text{ mV.s}^{-1}$ . Při DPV byly na elektrodu vkládány pulsy o šířce 100 ms a modulační amplitudě při měření redukcí  $-50 \text{ mV}$  a při měření oxidací  $50 \text{ mV}$ , vzorkovací perioda byla 20 ms.

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Agilent 8453 (Agilent, USA) v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1 cm.

Pracovní BDDFE byla testována redoxním systémem ferrokyanid/ferrikyjanid draselný tak, že byly naměřeny cyklické voltamogramy  $1.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  ferrokyanidu draselného v  $1 \text{ mol.l}^{-1}$  chloridu draselném při různých rychlostech polarizace (viz obr. 2.2). Velikosti proudů píků byly vyneseny proti druhé odmocnině z rychlosti polarizace a byla zjištěna lineární závislost. To vypovídá o ději kontrolovaném difúzí. V případě, že se na cyklických voltamogramech neobjevily žádné píky, byla elektroda zpasivována a elektroda musela být podrobena další aktivaci v kyselině dusičné o koncentraci  $1 \text{ mol.l}^{-1}$ . (kap 2.3.1.)



**Obr. 2.1** Schéma BDDFE v diskovém uspořádání. Teflonové tělo (1), elektrický kontakt (2), šroubovací nástavec (3), kovová pružina (4), mosazná lamela (5), BDDFE na křemíkové podložce (6), těsnění z vitonu (7), ústí elektrody – kontakt s roztokem (8). cit<sup>35</sup>



**Obr. 2.2** *Cyklické voltamogramy  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1} \text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  v  $1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KCl}$  při různých rychlostech polarizace. Na vloženém grafu je znázorněna lineární závislost proudů piků na odmocnině z rychlosti polarizace. Čísla v grafu odpovídají použitým rychlostem polarizace v  $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ .*

## 2.3 Pracovní postupy

### 2.3.1. Voltametrie

BDDFE se nejdříve aktivovala cyklickou voltametrií v kyselině dusičné o koncentraci  $1 \text{ mol.l}^{-1}$  ve 20 cyklech od 0 mV v potenciálovém rozsahu od  $-2500$  do  $2500 \text{ mV}$  a rychlosti nárůstu potenciálu  $100 \text{ mV.s}^{-1}$ . Elektroda byla pravidelně kontrolována cyklickou voltametrií, kdy byla sledována reverzibilita redoxního systému ferrokyanid/ferrikyanid. Cyklické voltamogramy byly měřeny v roztoku ferrokyanidu draselného o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  v  $1 \text{ mol.l}^{-1}$  chloridu draselném v potenciálovém rozsahu od  $-200$  do  $1000 \text{ mV}$ . Tímto procesem se kontrolovalo, jestli není elektroda zpasivována.

Při voltametričích měřeních bylo do polarografické nádoby odpipetováno příslušné množství zásobního roztoku studované látky ve vodě, a pak byl roztok doplněn BR pufrům o příslušném pH do objemu  $10 \text{ ml}$ . Každý nově připravený roztok pro voltametričké měření byl probubláván dusíkem po dobu  $3 \text{ minut}$ . Poté byl proveden záznam voltametričké křivky. Před každým dalším záznamem byl roztok  $15 \text{ s}$  probubláván. Všechny křivky byly měřeny třikrát a

poté statisticky vyhodnoceny. Mezi měřeními odlišných vzorků byla elektroda opláchnuta destilovanou vodou.

Při AdSV byla akumulace prováděna v míchaném roztoku. Po skončení akumulace bylo míchání vypnuto a po 10 s byl v ustáleném roztoku proveden záznam.

U DC voltametrie byl půlvlnový potenciál odečten v polovině naměřené vlny a proud byl při tomto potenciálu odečten mezi tečnami ke křivce před a za vlnou. Při DP voltametrii byl potenciál odečten v lokálním maximu píku a proud byl odečten od spojnice minim po stranách píku.

Při voltametrických měřeních CAP ve vzorku léčiva byl nejdříve připraven zásobní roztok léčiva, tak že do 10 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 32  $\mu$ l roztoku léčiva a byl doplněn destilovanou vodou po rysku. Poté bylo postupně do každé polarografické nádoby odpipetováno 100  $\mu$ l zásobního roztoku léčiva a k němu bylo odpipetováno příslušné množství roztoku chloramfenikolu (0, 0,2, 0,6, 1, 4 ml o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol.l<sup>-1</sup>), pak byl roztok doplněn BR pufrem o příslušném pH do objemu 10 ml. Takto připravený roztok byl použit pro voltmetrické měření.

Při stanovení ofloxacinu ve vzorku léčiva byla nejdříve spočítána průměrná hmotnost tablety z hmotnosti deseti tablet. Poté se 1 tableta rozpustila ve 100 ml destilované vody, vzniklý roztok se přefiltroval a z filtrátu se odpipetovalo 100  $\mu$ l do 10 ml odměrných baněk. Do odměrných baněk se dále odpipetovalo příslušné množství roztoku ofloxacinu (0,5, 1, 2, 3 ml o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol.l<sup>-1</sup>). Odměrné baňky byly nakonec doplněny BR pufrem o příslušném pH po rysku. Takto připravené roztoky byly použity pro voltmetrická měření.

Při stanovení ofloxacinu pomocí SPE byly pro předběžnou separaci a prekoncentraci studované látky použity kolony Lichrolut RP-18E (40-63  $\mu$ m) vhodné pro separaci velmi slabě polárních látek z vodného prostředí.

Extrakce tuhou fází byla prováděna následujícím postupem: kolonka SPE napojená na vývěvu byla před vlastní extrakcí aktivována promytím 3 ml methanolu, který byl následně vymyt 3 ml deionizované vody. Poté byl na kolonku nanesen modelový vzorek ofloxacinu v deionizované vodě (200 až 1000  $\mu$ l roztoku obsahujícího  $1 \cdot 10^{-3}$  mol.l<sup>-1</sup> OFL). Zachycený OFL byl eluován dvakrát 2 ml methanolu do 10ml odměrné baňky a doplněn BR pufrem po rysku. Poté byl roztok převeden do polarografické nádoby a po odstranění kyslíku (třiminutovým probubláváním dusíkem) byly zaznamenány voltamogramy metodou DCV na BDDFE.



Shodným postupem byl připraven slepý pokus s použitím deionizované vody neobsahující OFL. K němu bylo po zaznamenání voltamogramu přidáno příslušné množství OFL, které odpovídalo koncentraci v měřeném roztoku po SPE a znovu byly zaznamenány voltamogramy.

Procentuální výtěžek extrakce byl určen z poměru  $I_v/I_v^0$ , kde  $I_{1/2}$  značí velikost proudu v polovině vlny po provedené extrakci OFL z vodného roztoku a  $I_v^0$  značí velikost proudu v polovině vlny v roztoku připraveném přidávkem potřebného objemu standardního roztoku OFL k roztoku po extrakci slepého pokusu.

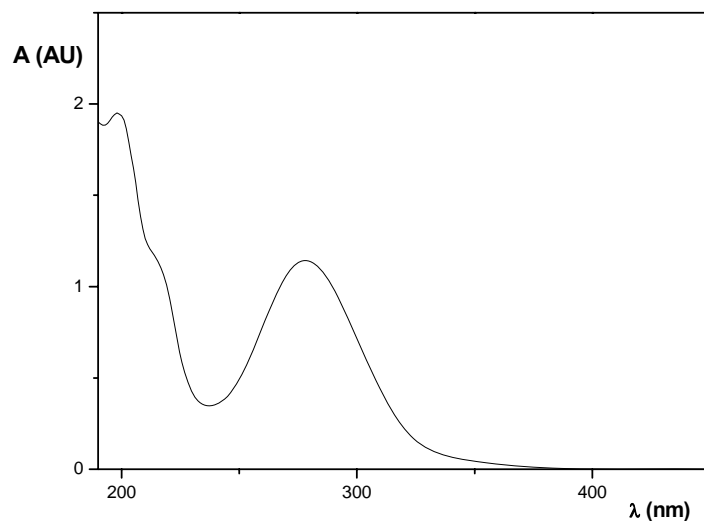
Vzorčky moči o objemu 50 ml byly před vlastní extrakcí nejdříve zfiltrány přes papírový filtr o velikosti póru 2,5  $\mu\text{m}$  a poté byly nanесeny na kolonku. Zachycený OFL byl eluován dvakrát 2 ml methanolu do 10 ml odměrné baňky a doplněn BR puřrem o PH 4 po rysku. Poté byl roztok převeden do polarografické nádoby a po odstranění kyslíku (třiminutovým probubláváním dusíkem) byly zaznamenány voltamogramy metodou DCV na BDDFE.

Veškerá měření byla prováděna za laboratorní teploty. Meze stanovitelnosti byly vyhodnoceny pomocí výpočtu desetinásobku směrodatných odchylek.<sup>51</sup>

## **2.3.2 Stálost zásobních roztoků**

### **2.3.2.1 Chloramfenikol**

Stálost zásobního roztoku CAP o koncentraci  $1.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  v destilované vodě byla po zředění destilovanou vodou na koncentraci  $1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  sledována spektrofotometricky v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm. Referentní kyveta byla naplněna destilovanou vodou. Absorbance zásobního roztoku byla měřena při vlnové délce  $\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$ , při které studovaná látka vykazovala absorpční maximum. Absorpční spektrum studované látky je uvedeno na Obr. 2.4. Výsledky měření stálosti zásobního roztoku jsou shrnuty v Tab. 2.2. Ze spektrofotometrického studia stálosti zásobního roztoku CAP uchovávaného za nepřístupu světla při laboratorní teplotě vyplývá, že CAP je po dobu více než měsíce stabilní.



**Obr. 2.3** Absorpční spektrum roztoku CAP ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) ve vodě. Měřeno v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda.

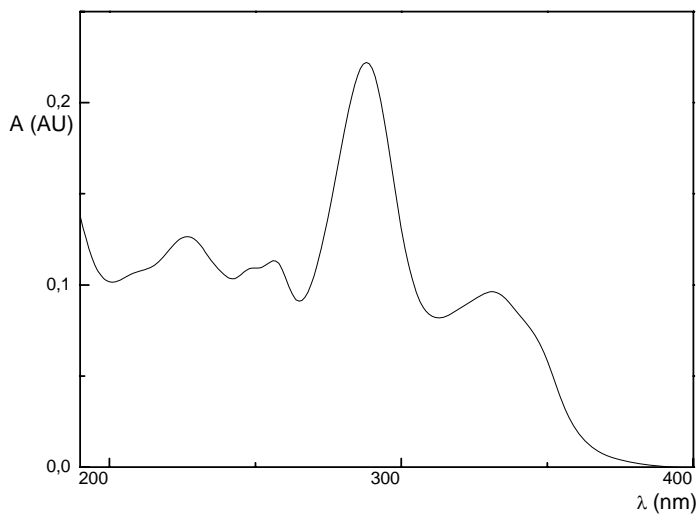
**Tab. 2.1** Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku CAP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  sledované při vlnové délce  $\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$ . Číselné hodnoty udávají relativní hodnotu absorbance v % proti hodnotě absorbance čerstvě připraveného roztoku.

Dny	Chloramfenikol	
	A	(%)
1	1,1631	100
4	1,1427	98,25
11	1,1375	97,80
18	1,1345	98,06
34	1,1436	98,33

### 2.3.2.2 Ofloxacin

Stálost zásobního roztoku ofloxacinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  v destilované vodě byla po zředění destilovanou vodou na koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  sledována spektrofotometricky v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm. Referentní kyveta byla naplněna destilovanou

vodou. Absorbance zásobního roztoku byla měřena při vlnové délce  $\lambda_{\max} = 287 \text{ nm}$ , při které studovaná látka vykazovala absorpční maximum. Absorpční spektrum studované látky je uvedeno na Obr. 2.4. Výsledky měření stálosti zásobního roztoku jsou shrnuty v Tab. 2.2. Ze spektrofotometrického studia stálosti zásobního roztoku OFL uchovávaného za nepřístupu světla při laboratorní teplotě vyplývá, že ofloxacin je po dobu více než dvaceti dní stabilní.



**Obr. 2.4** Absorpční spektrum roztoku OFL ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ) ve vodě. Měřeno v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda.

**Tab. 2.2** Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku OFL o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  sledované při vlnové délce  $\lambda_{\max} = 287 \text{ nm}$ . Číselné hodnoty udávají relativní hodnotu absorbance v % proti hodnotě absorbance čerstvě připraveného roztoku.

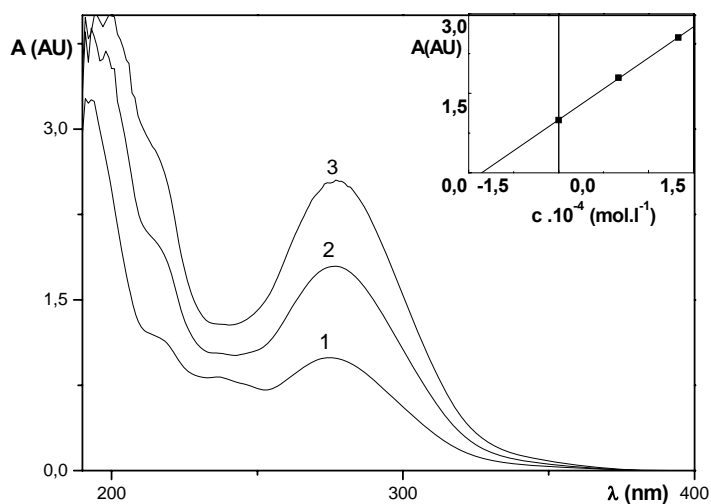
Dny	Ofloxacin	
	A	(%)
1	0,2395	100
3	0,2431	101
9	0,2460	103
15	0,2392	100
21	0,2389	100

### 3. Výsledky a diskuse

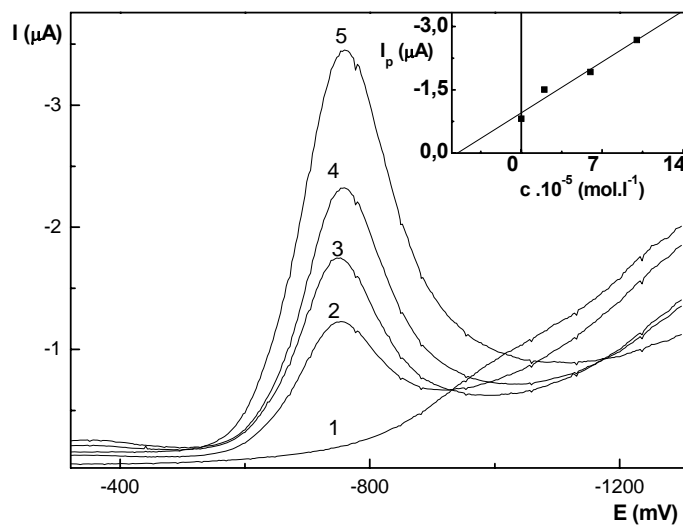
#### 3.1 Stanovení chloramfenikolu ve vzorku léčiva

Pro stanovení koncentrace CAP ve vzorku léčiva byla použita metoda standardního přídatku. Vzorek byl analyzován metodami DPV a DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 6, kde poskytoval nejvyšší signál. Vzorek byl připraven dle Kap. 2.3.1.

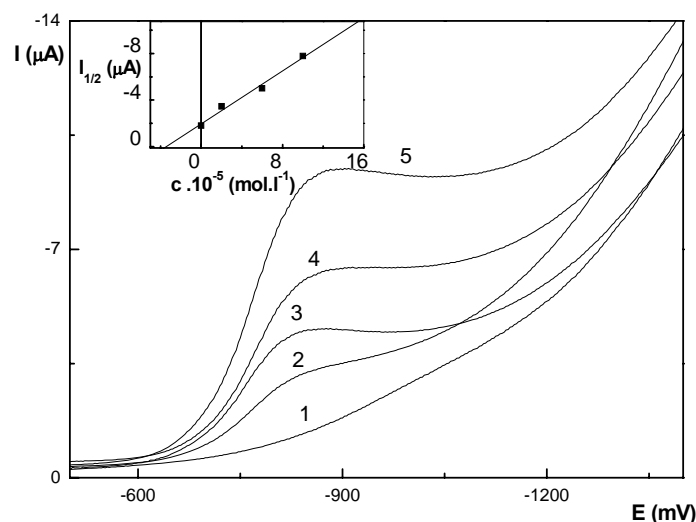
Koncentrace ve vzorku kapek měla být  $5 \text{ mg.ml}^{-1}$ . Jako srovnávací metoda pro stanovení koncentrace CAP byla zvolena UV spektrofotometrie při vlnové délce 278 nm. (viz Obr. 3.1). Zjištěné koncentrace ve vzorku kapek byly při DPV  $9,6 \pm 0,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ , výtěžek byl  $96 \pm 7\%$  a při DCV  $9,2 \pm 0,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ , výtěžek byl  $92 \pm 7\%$ . Stanovené množství je uvedeno v Tab. 3.1. Na Obr. 3.2 jsou znázorněny DP voltamogramy CAP včetně příslušné koncentrační závislosti a na Obr. 3.3 jsou znázorněny DC voltamogramy CAP včetně příslušné koncentrační závislosti.



**Obr. 3.1** UV spektrofotometrické stanovení koncentrace CAP ve vzorku kapek metodou standardního přídatku. (1) vzorek; (2) vzorek s přídatkem CAP na koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ; (3) vzorek s přídatkem CAP na koncentraci  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Na vloženém grafu je znázorněno stanovení koncentrace CAP ve vzorku léčiva metodou standardního přídatku.



**Obr. 3.2** Voltamogramy CAP měřené technikou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 6. (1) základní elektrolyt; (2) vzorek v základním elektrolytu; (3) vzorek s přidavkem CAP na koncentraci  $0,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ; (4) vzorek s přidavkem CAP na koncentraci  $0,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ; (5) vzorek s přidavkem CAP na koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Na vloženém grafu je znázorněno stanovení koncentrace CAP ve vzorku léčiva metodou standardního přidavku.



**Obr. 3.3** Voltamogramy CAP měřené technikou DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 6. (1) základní elektrolyt; (2) vzorek v základním elektrolytu; (3) vzorek s přidavkem CAP na koncentraci  $0,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ; (4) vzorek s přidavkem CAP na koncentraci  $0,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ; (5) vzorek s přidavkem CAP na koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Na vloženém grafu je znázorněno stanovení koncentrace CAP ve vzorku léčiva metodou standardního přidavku.

**Tab. 3.1** Stanovení CAP ve vzorku léčiva metodami DPV a DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 6 metodou standardního přidavku a statistické vyhodnocení.

	Deklarovaný obsah	Stanovený obsah		
		DPV	DCV	UV
		<i>Spektrofotometrie</i>		
<b>Koncentrace</b> <b>[mol.l<sup>-1</sup>]</b>	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$9,6 \pm 0,7 \cdot 10^{-5}$	$9,2 \pm 0,7 \cdot 10^{-5}$	$9,9 \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$
<b>Výtěžek</b> <b>[%]</b>	100	$96 \pm 7$	$92 \pm 7$	$99 \pm 3$

## 3.2. Stanovení ofloxacinu

### 3.2.1 DC Voltametrie

#### 3.2.1.1 Vliv pH

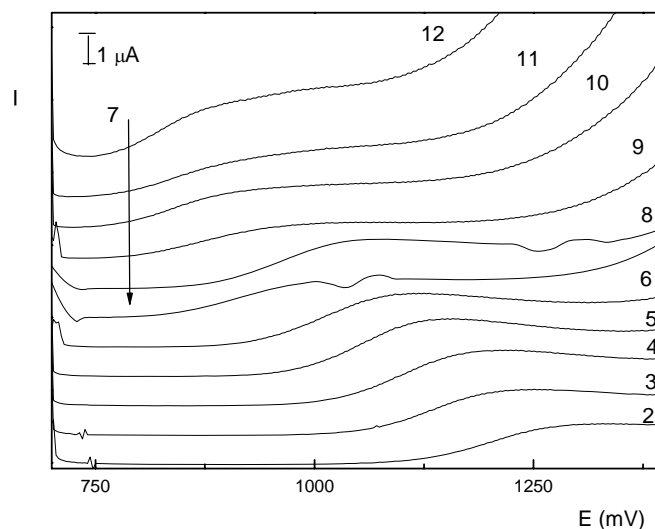
Vliv pH na chování OFL ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) při DCV na BDDFE byl sledován v prostředí BR pufru o pH 2,0 až 12,0. Látka poskytuje v celé oblasti pH dvě vlny. Jednu vlnu poskytuje v katodické oblasti potenciálů a druhou v anodické oblasti potenciálů. Pro sledování vlivu pH byla vybrána vlna, která se tvoří v anodické oblasti potenciálů, protože měla lepší tvar a byla větší. Půlvalnový potenciál s rostoucím pH od pH 2 do pH 12 lineárně klesal. Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 4, kde OFL poskytoval nejvyšší signál. Zaznamenané voltametrické křivky ukazuje Obr. 3.4.

Metodou lineární regrese byly pro závislost potenciálu DC voltametrické vlny  $E_{1/2}$  na pH vypočteny vztahy:

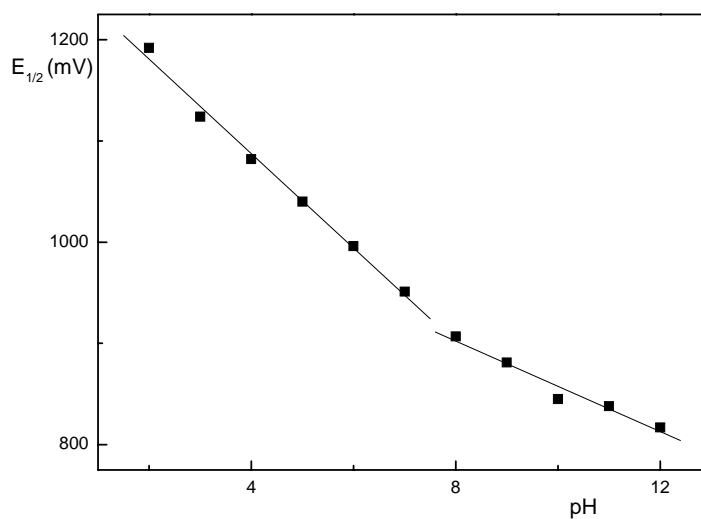
pro pH od 2,0 do 7,0:  $E_{1/2} [\text{mV}] = -46,43 \text{ pH} - 1272,8$  (korelační koeficient 0,9917)

pro pH od 8,0 do 12,0:  $E_{1/2} [\text{mV}] = -22,3 \text{ pH} - 1080,6$  (korelační koeficient 0,9602)

Výšky vln v celé oblasti pH kolísaly mezi hodnotou 1 – 2  $\mu\text{A}$ , kromě výšek vln od pH 4 do pH 6, kdy byly výšky vln vyšší než 2  $\mu\text{A}$ . Při pH 4 byla výška vlny nejvyšší. Zjištěné závislosti půlvalnových potenciálů  $E_{1/2}$  a proudů vln  $I_v$  na pH roztoku jsou uvedeny v Tab. 3.2. Graficky je závislost  $E_{1/2}$  na pH znázorněna na Obr. 3.5.



**Obr. 3.4** Voltamogramy OFL ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) měřené technikou DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 2–12 . Čísla v grafu odpovídají použitému pH.



**Obr. 3.5** Závislost půlvolného potenciálu  $E_{1/2}$  OFL ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) na pH roztoku, měřeno technikou DCV na BDDFE v prostředí BR pufru.



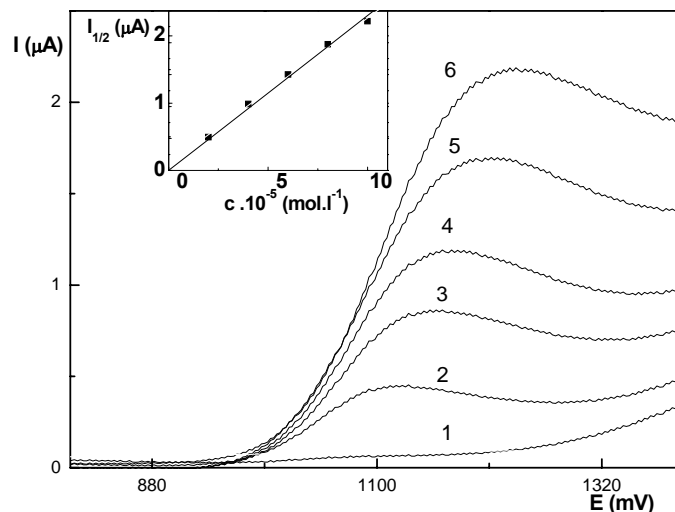
**Tab. 3.2** Vliv pH na půlvolnové potenciály a proudy vln OFL ( $c=1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) při měření na BDDFE v prostředí BR pufru.

<i>pH</i>	$E_{1/2} \text{ (mV)}$	$I_p \text{ (nA)}$
2,0	1192	1446
3,0	1122	1834
4,0	1082	2676
5,0	1040	2308
6,0	996	2031
7,0	951	1870
8,0	907	1609
9,0	881	1196
10,0	845	1044
11,0	838	1015
12,0	817	1179

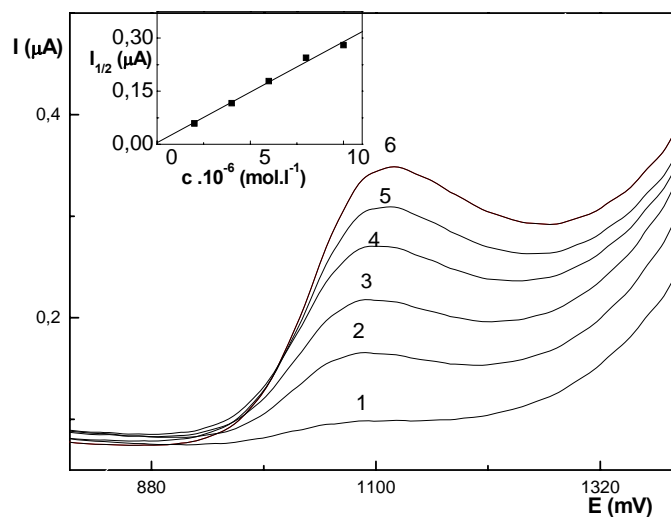
### 3.2.1.2 Koncentrační závislost

Koncentrační závislosti OFL byly proměřeny koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  –  $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  metodou DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 4, kde OFL poskytoval nejvyšší signál.

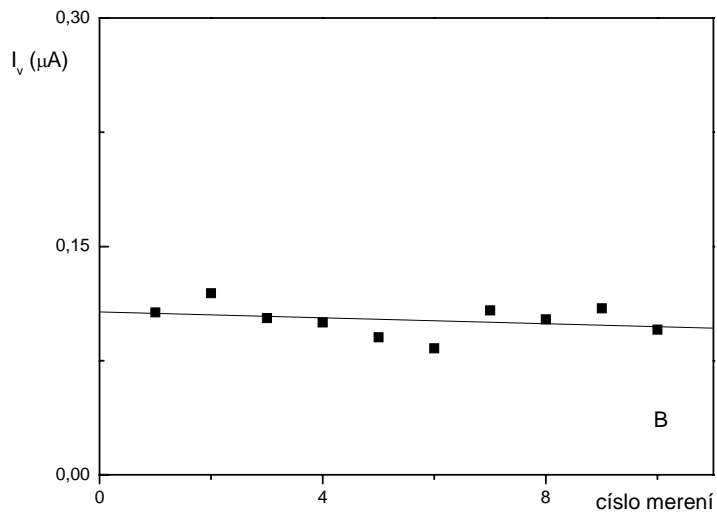
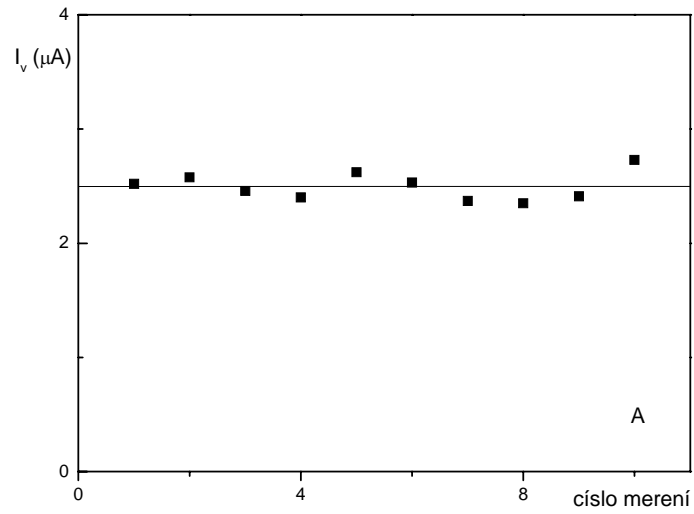
Při měření při koncentraci OFL  $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  byla relativní směrodatná odchylka opakovatelných měření 4,6%, a při měření při koncentraci OFL  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  byla relativní směrodatná odchylka 9,6%, takže látka nadměrně nepasivuje povrch elektrody. Závislost výšky DC voltametrické vlny na koncentraci v oblasti koncentrace OFL od  $1 \cdot 10^{-4}$  do  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  a od  $1 \cdot 10^{-5}$  do  $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  je lineární. Parametry kalibračních přímek a meze stanovitelnosti jsou uvedeny v Tab. 3.3. Na Obr. 3.6 jsou zobrazeny DC voltamogramy OFL v koncentračním rozmezí  $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  a na Obr. 3.7 jsou zobrazeny DC voltamogramy v koncentračním rozmezí  $(2 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ . Na Obr. 3.8 je zobrazena závislost proudu DC voltametrické vlny na počtu měření při koncentracích OFL  $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  a  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ , ze které vyplývá, že nedochází při měření k pasivaci elektrody. Pro OFL bylo dosaženo meze stanovitelnosti  $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ .



**Obr. 3.6** Voltamogramy OFL měřené technikou DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 4.  $c(\text{OFL})$ : (1) 0; (2)  $2 \cdot 10^{-5}$ ; (3)  $4 \cdot 10^{-5}$ ; (4)  $6 \cdot 10^{-5}$ ; (5)  $8 \cdot 10^{-5}$ ; (6)  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Na vloženém grafu je znázorněna závislost proudů vln  $I_p$  na koncentraci v rozmezí  $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ .



**Obr. 3.7** Voltamogramy OFL měřené technikou DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 4.  $c(\text{OFL})$ : (1) 0; (2)  $2 \cdot 10^{-6}$ ; (3)  $4 \cdot 10^{-6}$ ; (4)  $6 \cdot 10^{-6}$ ; (5)  $8 \cdot 10^{-6}$ ; (6)  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ . Na vloženém grafu je znázorněna závislost proudů vln  $I_p$  na koncentraci v rozmezí  $(2 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ .



**Obr. 3.8** Závislost proudů vln  $I_v$  na počtu měření. Koncentrace OFL byla  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (A) a  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (B). Měřeno technikou DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 4.

**Tab. 3.3** Parametry kalibračních přímek pro stanovení OFL metodou DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 4.

<i>Koncentrace</i> [mol.l <sup>-1</sup> ]	<i>Směrnice</i> [nA.mol <sup>-1</sup> .l]	<i>Úsek</i> [nA]	<i>Koef. korelace</i>	<i>LOQ</i> [mol.l <sup>-1</sup> ]
(2 – 10) .10 <sup>-5</sup>	2,17 .10 <sup>7</sup>	99,4	0,9983	-
(2 – 10) .10 <sup>-6</sup>	2,82 .10 <sup>7</sup>	32,2	0,9963	4 .10 <sup>-7</sup>

### 3.2.2 Diferenční pulzní voltametrie

#### 3.2.2.1 Vliv pH

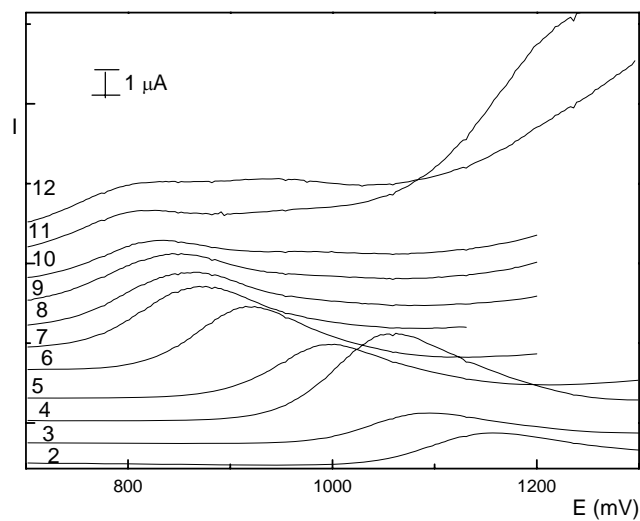
Vliv pH na chování OFL ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) při DPV na BDDFE byl sledován v prostředí BR pufru o pH 2,0 až 12,0. Látka poskytuje v celé oblasti pH dva píky. Jeden pík poskytuje v katodické oblasti potenciálů a druhý v anodické oblasti potenciálů. Pro sledování vlivu pH byl vybrán pík, který se tvoří v anodické oblasti potenciálů, protože měl lepší tvar a byl větší. S rostoucím pH od pH 2 do pH 12 potenciál DP píku klesal. Jako optimální bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 4, kde OFL poskytoval nejvyšší signál. Zaznamenané DP voltametrické křivky ukazuje Obr. 3.9.

Metodou lineární regrese byly pro závislost potenciálu DC voltametrického píku  $E_p$  na pH v rozmezí pH 2,0 – 12,0 vypočten vztah:

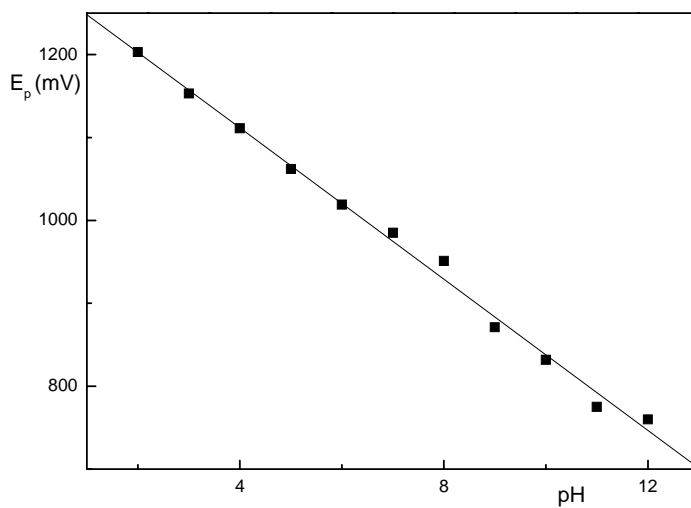
$$E_p [\text{mV}] = -79,5 \text{ pH} - 324 \text{ (korelační koeficient } 0,9995)$$

Výšky píků mezi pH 2 – 7 byly stálé mezi hodnotou 500 – 700 nA, kromě pH 4, kdy byla výška píku nejvyšší. Pro vyšší pH výška píku kolísala mezi hodnotami od 150 – 700 nA.

Zjištěné závislosti potenciálu píku  $E_p$  a proudu píku  $I_p$  na pH roztoku jsou uvedeny v Tab. 3.4. Graficky je závislost  $E_p$  na pH znázorněna na Obr. 3.10.



**Obr. 3.9** Voltamogramy OFL ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřené technikou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 2–12. Čísla uvedená v grafu odpovídají pH.



**Obr. 3.10** Závislost potenciálu píku  $E_p$  OFL ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) na pH roztoku, měřeno technikou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru.

**Tab. 3.4** Vliv pH na potenciály a proudy píku OFL ( $c=1.10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>) při měření na BDDFE v prostředí BR pufru.

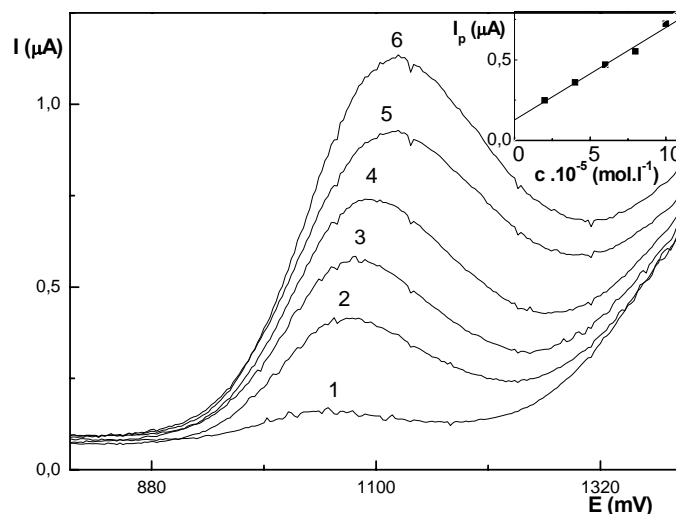
<i>pH</i>	<i>E<sub>p</sub> [mV]</i>	<i>I<sub>p</sub> [nA]</i>
2,0	1203	629,4
3,0	1153	530,3
4,0	1111	848,6
5,0	1062	628,1
6,0	1019	626,3
7,0	985	676,5
8,0	951	339,2
9,0	871	303,0
10,0	832	128,4
11,0	775	324,3
12,0	760	674,9

### 3.2.2.2 Koncentrační závislost

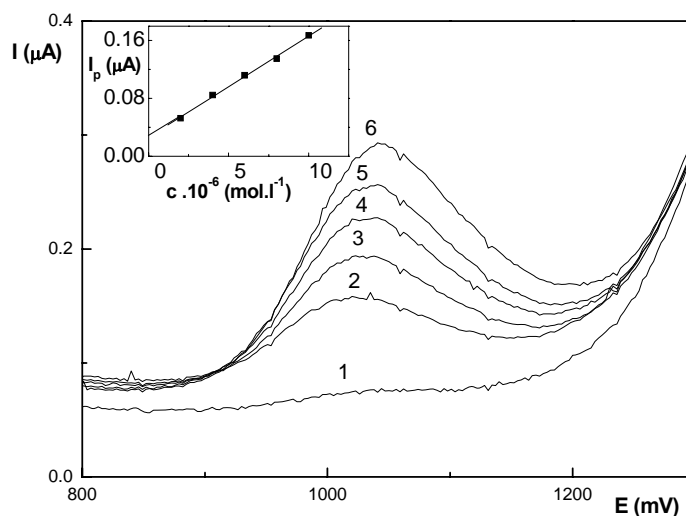
Koncentrační závislosti OFL byly proměřeny v koncentračním rozmezí  $1.10^{-4} - 2.10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> metodou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 4, kde poskytoval nejvyšší signál.

Při měření při koncentraci OFL  $2.10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> byla relativní směrodatná odchylka opakovatelných měření 3,4% a při měření při koncentraci OFL  $1.10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> byla relativní směrodatná odchylka 9,8%, takže látka nadměrně nepasivuje povrch elektrody.

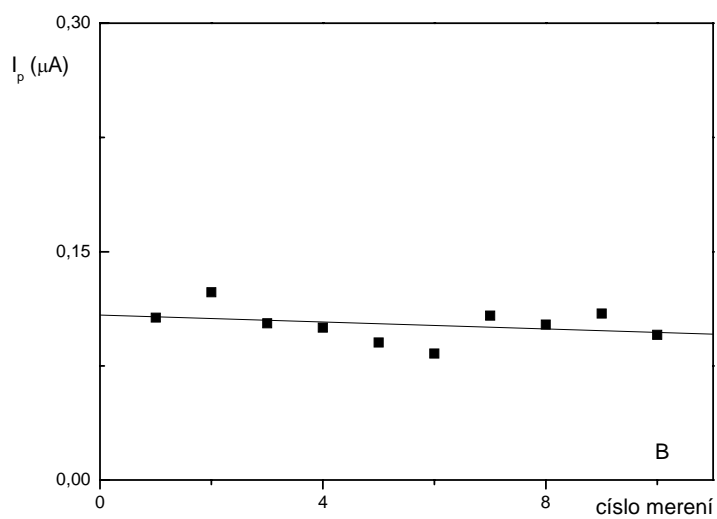
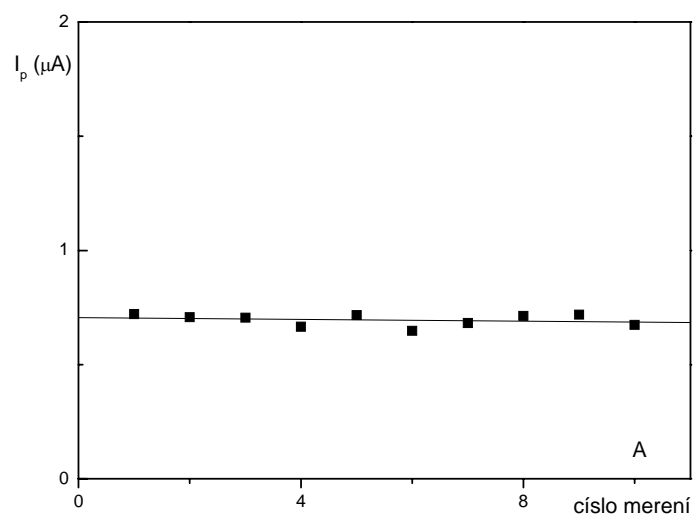
Závislost výšky píku na koncentraci v oblastech koncentrace od  $1.10^{-4}$  do  $2.10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> a od  $1.10^{-5}$  do  $2.10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> je lineární, ale směrnice koncentračních řádů se významně liší. To může být dáno saturací povrchu elektrody analytem, což odpovídá i velkému úseku vyššího koncentračního rozsahu. Parametry kalibračních přímků a mez stanovitelnosti jsou uvedeny v Tab. 3.5. Na Obr. 3.11 jsou zobrazeny DP voltamogramy OFL v koncentračním rozmezí  $(2 - 10) \cdot 10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> a na Obr. 3.12 jsou zobrazeny DP voltamogramy OFL v koncentračním rozmezí  $(2 - 10) \cdot 10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup>. Na Obr. 3.13 je zobrazena závislost proudu píku na počtu měření při koncentracích OFL  $2.10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> a  $1.10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>, ze které vyplývá, že nedochází při měření k pasivaci elektrody. Pro OFL bylo dosaženo meze stanovitelnosti  $1.10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup>.



**Obr. 3.11** Voltamogramy OFL měřené technikou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 4.  $c(\text{OFL})$ : (1) 0; (2)  $2 \cdot 10^{-5}$ ; (3)  $4 \cdot 10^{-5}$ ; (4)  $6 \cdot 10^{-5}$ ; (5)  $8 \cdot 10^{-5}$ ; (6)  $1 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>. Na vloženém grafu je znázorněna závislost proudu píku  $I_p$  na koncentraci v rozmezí  $(2 - 10) \cdot 10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup>.



**Obr. 3.12** Voltamogramy OFL měřené technikou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 4.  $c(\text{OFL})$ : (1) 0; (2)  $2 \cdot 10^{-6}$ ; (3)  $4 \cdot 10^{-6}$ ; (4)  $6 \cdot 10^{-6}$ ; (5)  $8 \cdot 10^{-6}$ ; (6)  $1 \cdot 10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup>. Na vloženém grafu je znázorněna závislost proudu píku  $I_p$  na koncentraci v rozmezí  $(2 - 10) \cdot 10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup>.



**Obr. 3.13** Závislost proudu píku  $I_p$  na počtu měření. Koncentrace OFL byla  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (A) a  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (B). Měřeno technikou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 4.



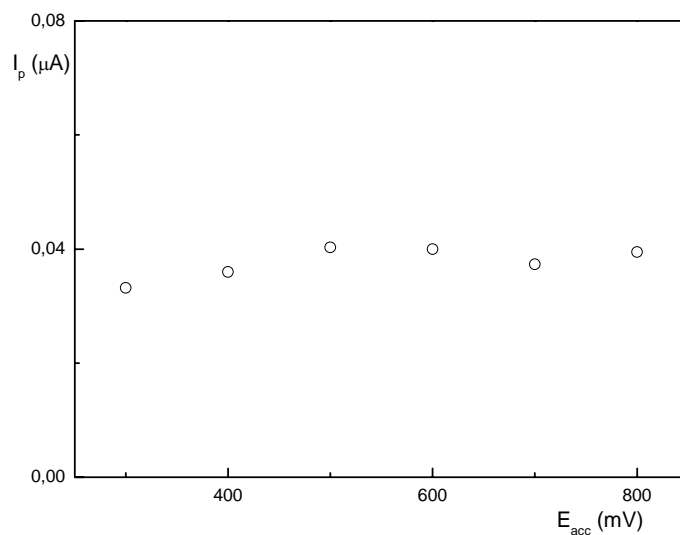
**Tab. 3.5** Parametry kalibračních přímek pro stanovení OFL metodou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 4.

<i>Koncentrace</i> [mol.l <sup>-1</sup> ]	<i>Směrnice</i> [nA.mol <sup>-1</sup> .l]	<i>Úsek</i> [nA]	<i>Koef. korelace</i>	<i>LOQ</i> [mol.l <sup>-1</sup> ]
(2 – 10) .10 <sup>-5</sup>	9,15.10 <sup>6</sup>	147,5	0,9935	-
(2 – 10) .10 <sup>-6</sup>	1,40.10 <sup>7</sup>	26,10	0,9986	1 .10 <sup>-6</sup>

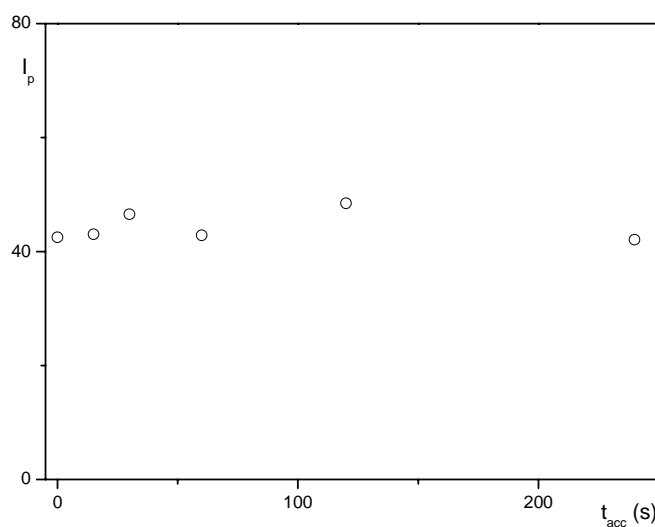
### 3.2.3 Adsorpční rozpouštěcí voltametrie

Adsorpční rozpouštěcí voltametrie byla použita v prostředí BR pufru o pH 4, které bylo optimální pro DPV (viz. Kap. 3.2.2) při koncentraci OFL 4.10<sup>-6</sup> mol.l<sup>-1</sup>. Byl proměřen vliv potenciálu akumulace na výšku píku studované látky v rozmezí 300 až 800 mV (Obr. 3.14). Roztok byl při akumulaci míchán a doba akumulace byla 60 s. Vzhledem k tomu, že nebyla pozorována větší změna signálu byl pro sledování vlivu doby akumulace  $t_{acc}$  na výšku píku OFL zvolen potenciál akumulace  $E_{acc} = 600$  mV. Vliv doby akumulace na výšku píku OFL byl sledován pro  $t_{acc} = 20, 40, 60, 120$  a 240 (viz. Obr. 3.15). Akumulace byla prováděna v míchaném roztoku.

Akumulace neměla na signál studované látky takový vliv, aby bylo možno dosáhnout nižší meze stanovitelnosti než při stanovení metodami DPV a DCV na BDDFE.



**Obr. 3.14** Závislost proudu píku  $I_p$  na potenciálu akumulace OFL ( $c = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) v míchaném roztoku. Měřeno technikou AdSV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH

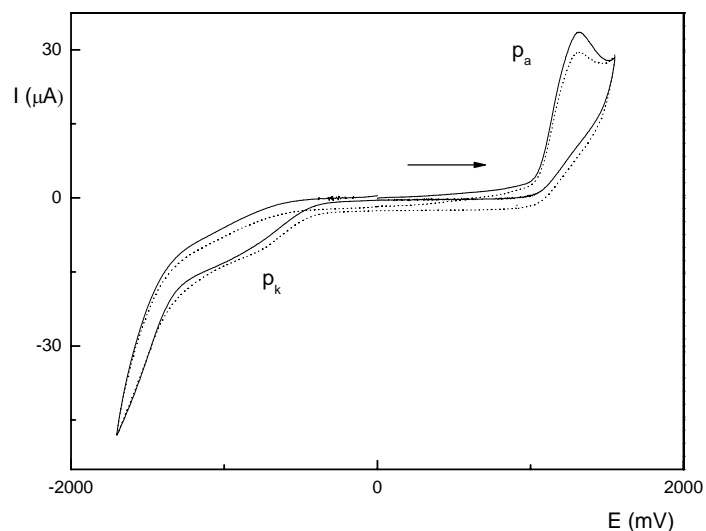


**Obr. 3.15** Závislost proudu píku  $I_p$  na době akumulace OFL ( $c = 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) v míchaném roztoku. Měřeno technikou AdSV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 4.  $E_{acc} = 600 \text{ mV}$ .

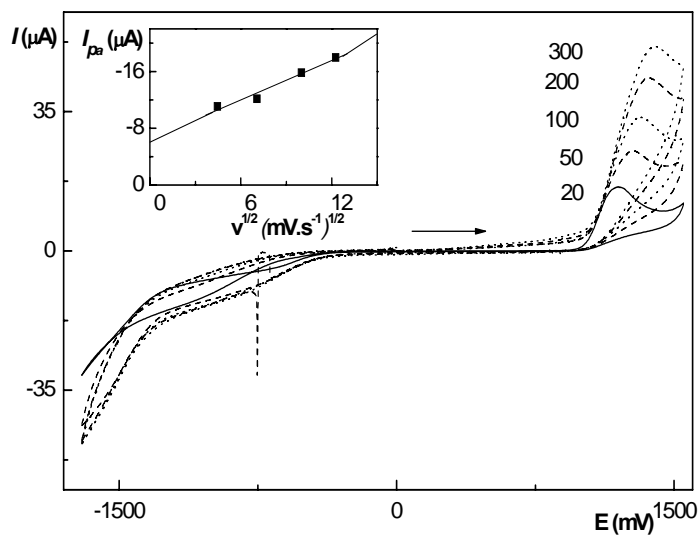
### 3.2.4 Cyklická voltametrie

V roztoku OFL o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  v prostředí BR pufru o pH 4 byly měřeny tři cykly v potenciálovém rozsahu od 1550 do  $-1770 \text{ mV}$  a tři cykly v potenciálové rozsahu od  $-1770$  do  $1550 \text{ mV}$ . Počáteční potenciál byl  $0 \text{ mV}$ . V obou směrech cyklické voltametrie se objevily dva píky. Při prvním cyklu se první pík se objevil při potenciálu  $1140 \text{ mV}$  a druhý pík se objevil při potenciálu  $-670 \text{ mV}$ . Ve druhém a třetím cyklu se oba píky už jen snížily. Katodický pík při potenciálu  $p_k = -670 \text{ mV}$  odpovídá redukci oxoskupin na hydroxylové skupiny. Anodický pík při potenciálu  $p_a = 1140 \text{ mV}$  odpovídá oxidaci 4-methylpiperazin-1-ylové skupiny, která se chová jako aminová skupina. Voltamogramy dvou prvních cyklů v potenciálovém rozsahu od  $1550$  do  $-1770 \text{ mV}$  jsou znázorněny na Obr. 3.16. Dále byly naměřeny cyklické voltamogramy OFL při různých rychlostech polarizace v potenciálové rozsahu od  $-1770$  do  $1550 \text{ mV}$  (viz. Obr. 3.17) i v potenciálovém rozsahu od  $1550$  do  $-1770 \text{ mV}$  (viz. Obr. 3.18). Na vložených grafech jsou znázorněny příslušné závislosti velikosti proudu píku  $I_p$  na druhé odmocnině z rychlosti polarizace  $v$ . Z lineárních průběhů těchto závislostí se dá usuzovat na difúzi řízený mechanismus u obou dějů.

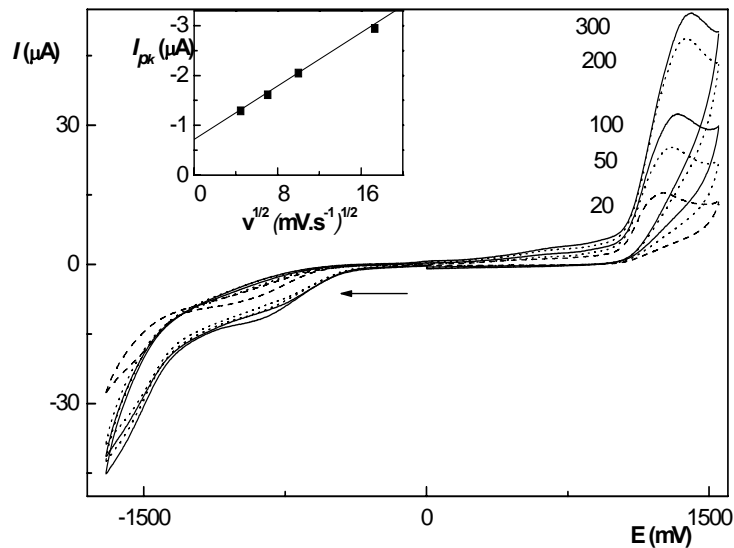
Dále byla ještě sledována závislost katodického proudu píku v závislosti na pH při pH 2 (Obr. 3.19), 4 (Obr. 3.20), 7 (Obr. 3.21), 10 (Obr. 3.22) a 12 (Obr. 3.23). Proud katodického píku byl největší v prostředí BR pufru o pH 7.



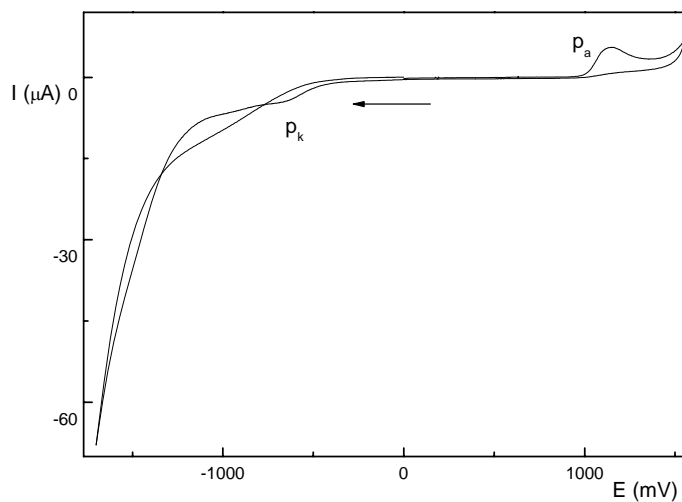
**Obr. 3.16** Cyklický voltamogram OFL ( $c=5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 4 při obou cyklech. Měřeno ve směru od 0 mV k 1550 mV poté k -1770 mV a zpět k 0 mV. První cyklus- plná čára; druhý cyklus-tečkovaná čára.



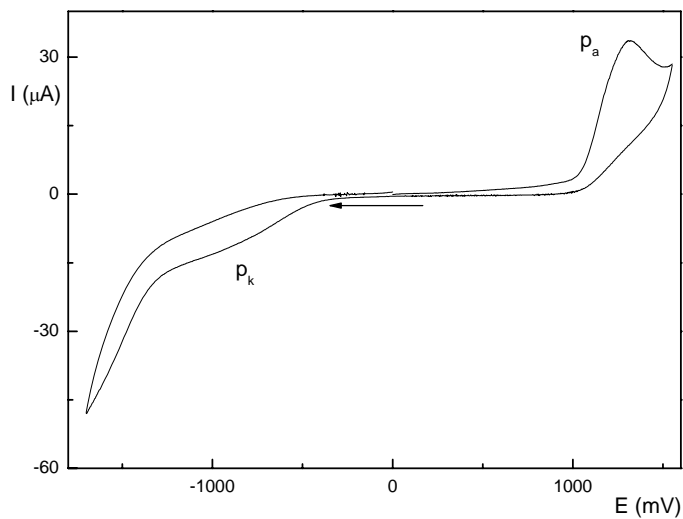
**Obr. 3.17** Cyklické voltamogramy OFL ( $c=1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) při různých rychlostech polarizace v prostředí BR pufru o pH 4. Na vloženém grafu je znázorněna lineární závislost proudů anodických piků odmocnině z rychlosti polarizace. Čísla v grafu odpovídají použitým rychlostem polarizace v  $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . Měřeno ve směru od 0 mV k 1550 mV poté k -1770 mV a k 0 mV.



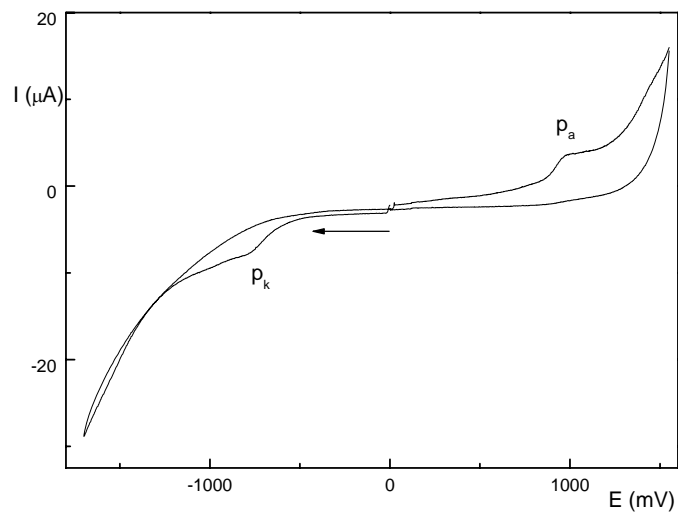
**Obr. 3.18** Cyklické voltamogramy OFL ( $c=1\cdot 10^{-4}$  mol. $\Gamma^{-1}$ ) při různých rychlostech polarizace v prostředí BR pufru o pH 4. Na vloženém grafu je znázorněna lineární závislost proudů katodických piků na odmocnině z rychlosti polarizace. Čísla v grafu odpovídají použitým rychlostem polarizace v  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Měřeno ve směru od 0 mV k -1770 mV poté k 1550 mV a k 0 mV



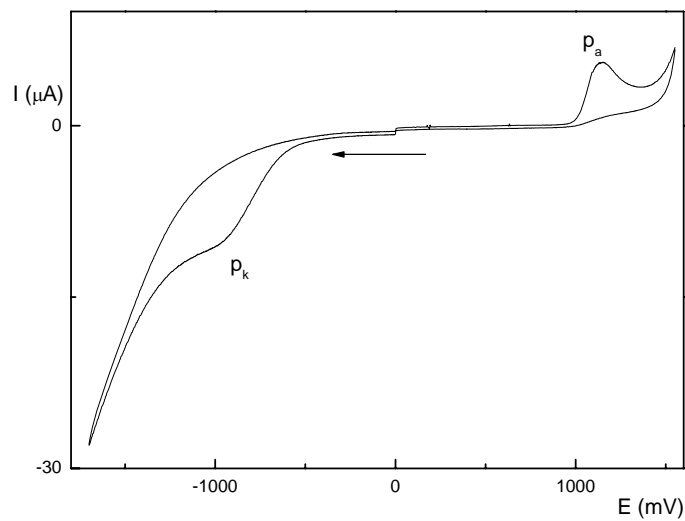
**Obr. 3.19** *Cyklické voltamogramy OFL ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) měřené technikou CV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 2. Měřeno ve směru od 0 mV k -1770 mV poté k 1550 mV a zpět k 0 mV.*



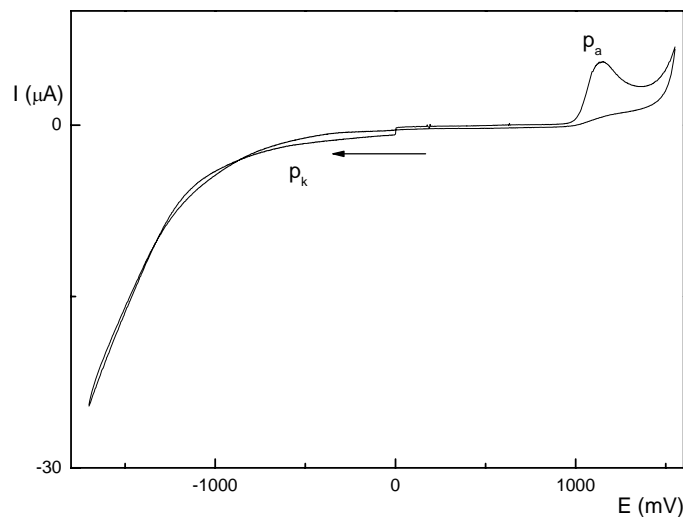
**Obr. 3.20** *Cyklické voltamogramy OFL ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) měřené technikou CV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 4. Měřeno ve směru od 0 mV k -1770 mV poté k 1550 mV a zpět k 0 mV.*



**Obr. 3.21** *Cyklické voltamogramy OFL ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) měřené technikou CV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 7. Měřeno ve směru od 0 mV k -1770 mV poté k 1550 mV a zpět k 0 mV.*



**Obr. 3.22** *Cyklické voltamogramy OFL ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) měřené technikou CV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 10. Měřeno ve směru od 0 mV k -1770 mV poté k 1550 mV a zpět k 0 mV.*



**Obr. 3.23** *Cyklické voltamogramy OFL ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) měřené technikou CV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 12. Měřeno ve směru od 0 mV k -1770 mV poté k 1550 mV a zpět k 0 mV.*

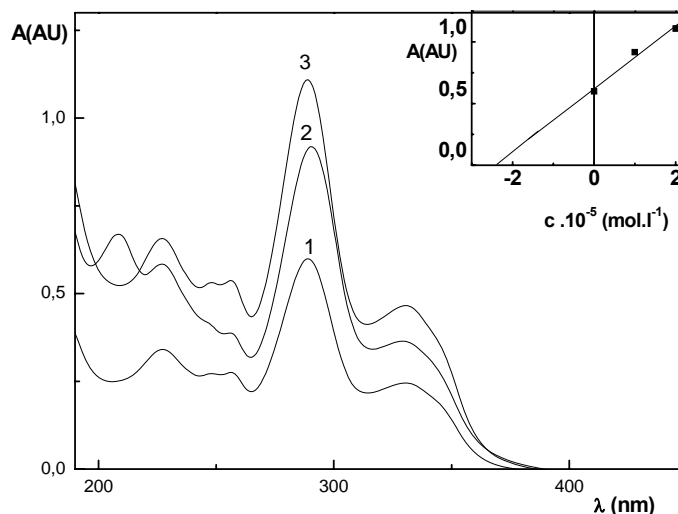
### 3.3 Stanovení ofloxacinu ve vzorku léčiva

Pro stanovení koncentrace OFL ve vzorku léčiva byla použita metoda standardního přídávku. Vzorek byl analyzován metodami DPV a DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 4, kde poskytoval nejvyšší signál. Vzorek byl připraven dle Kap. 2.3.1.

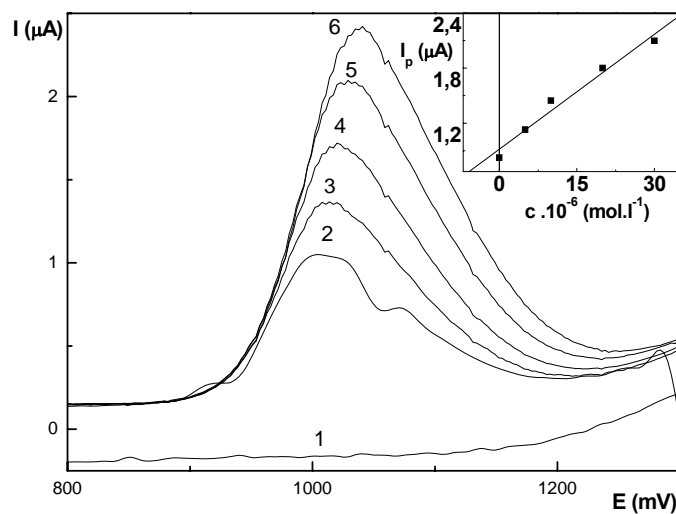
Koncentrace ve vzorku tablet měla být 100 mg OFL/1 tableta. Jako srovnávací metoda pro stanovení koncentrace OFL byla zvolena UV spektrofotometrie při vlnové délce 287 nm. (viz. Obr. 3.24). Spektrofotometrické měření bylo prováděno při vlnové délce 287 nm, kdy absorbuje levotočivá i pravotočivá složka OFL stejně. Pro DPV a DCV byly použity optimální podmínky dle kapitol 3.2.1 a 3.2.2. Zjištěné koncentrace ve vzorku tablet byly při DPV  $2,5 \pm 0,410^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ , výtěžek byl  $93 \pm 1\%$  a při DCV  $2,7 \pm 0,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ , výtěžek byl  $100 \pm 1\%$ .

Stanovené množství je uvedeno v Tab. 3.6. Na Obr. 3.25 jsou znázorněny DP voltamogramy OFL včetně příslušné koncentrační závislosti a na Obr. 3.26 jsou znázorněny DC voltamogramy OFL včetně příslušné koncentrační závislosti.



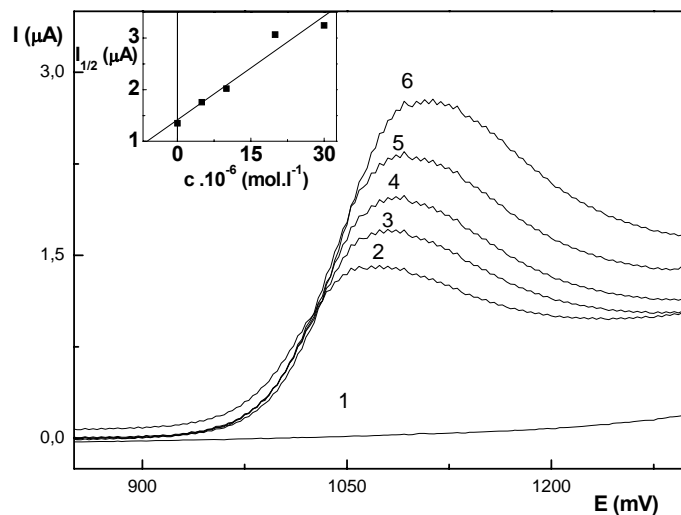


**Obr. 3.24** Stanovení koncentrace OFL ve vzorku kapek metodou standardního přídavku, (1) vzorek; (2) vzorek s přídavkem OFL na koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ; (3) vzorek s přídavkem OFL na koncentraci  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ; Na vloženém grafu je znázorněno stanovení koncentrace OFL ve vzorku léčiva metodou standardního přídavku.



**Obr. 3.25** Voltamogramy OFL měřené technikou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 6. (1) základní elektrolyt; (2) vzorek v základním elektrolytu; (3) vzorek s přídavkem OFL na koncentraci  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ ; (4) vzorek s přídavkem OFL na koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ; (5) vzorek s přídavkem OFL na koncentraci  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ; (6) vzorek s přídavkem OFL na koncentraci  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ .

$3 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ . Na vloženém grafu je znázorněna závislost  $I_p$  na koncentraci OFL při stanovení ve vzorku léčiva metodou standardního přídatku.



**Obr. 3.26** Voltamogramy OFL měřené technikou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 6. (1) základní elektrolyt; (2) vzorek v základním elektrolytu; (3) vzorek s přídatkem OFL na koncentraci  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ ; (4) vzorek s přídatkem OFL na koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ; (5) vzorek s přídatkem OFL na koncentraci  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ; (6) vzorek s přídatkem OFL na koncentraci  $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ . Na vloženém grafu je znázorněna závislost  $I_p$  na koncentraci OFL při stanovení ve vzorku léčiva metodou standardního přídatku.

**Tab. 3.6** Stanovení OFL ve vzorku léčiva metodami DPV a DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 6 a UV spektrometrií metodou standardního přídatku.

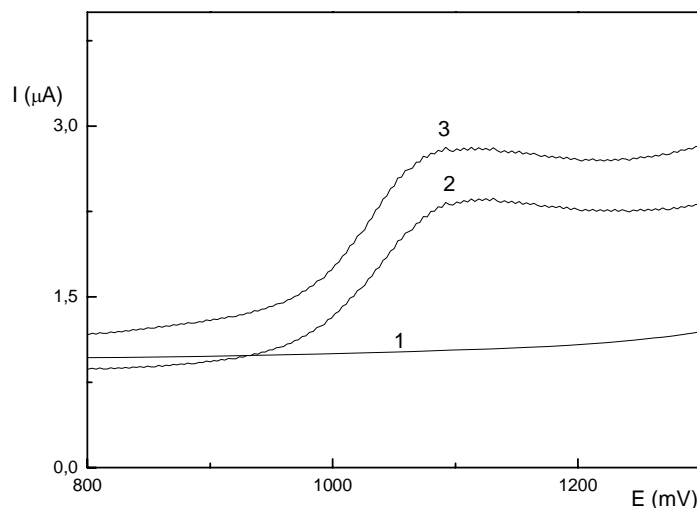
	Deklarovaný obsah	Stanovený obsah		
		DPV	DCV	UV Spektrofotometrie
Koncentrace [ $\text{mol.l}^{-1}$ ]	$2,7 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \pm 0,4 \cdot 10^{-5}$	$2,7 \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$	$2,4 \pm 0,4 \cdot 10^{-5}$
Výtěžek [%]	100	$93 \pm 1$	$100 \pm 1$	$89 \pm 1$

### 3.5 Extrakčně-voltametrické stanovení ofloxacinu

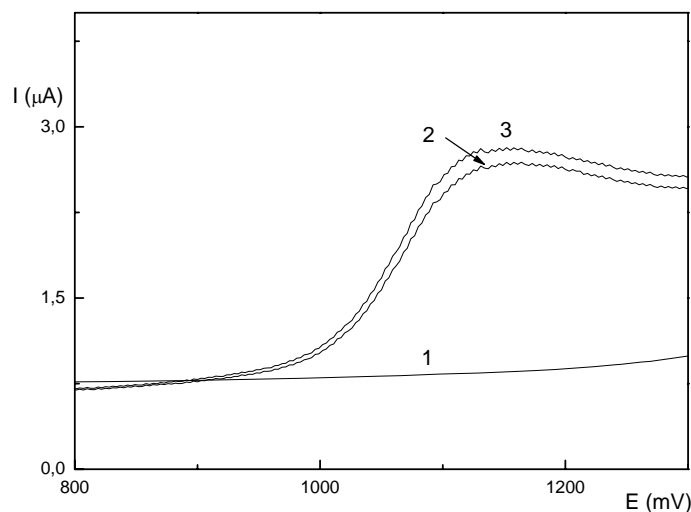
#### 3.5.1 Stanovení ofloxacinu po extrakci tuhou fází

Extrakce ofloxacinu tuhou fází byla optimalizována se vzorky deionizované vody a následně ověřena změřením kalibrační závislosti modelových vzorků deionizované vody a změřením standardního přídatku vzorku moči.

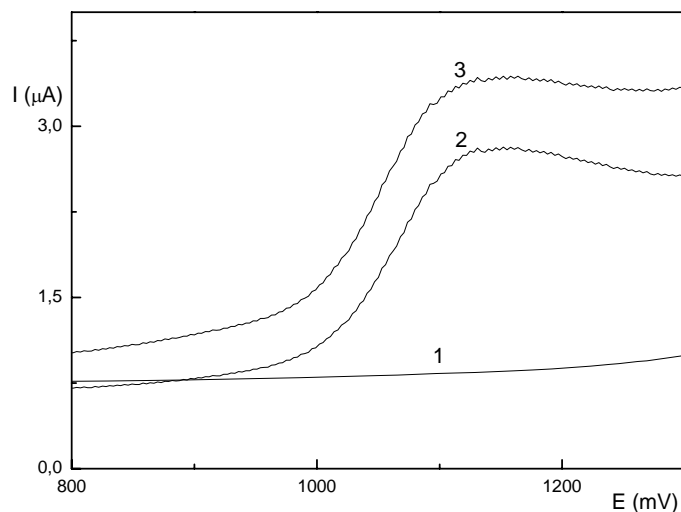
Nejdříve byl hledán vhodný postup eluce OFL z kolonky SPE. Eluce OFL byla zkoušena těmito třemi způsoby. Eluce 2 ml methanolu (viz. Obr. 3.27), eluce dvakrát 2 ml methanolu (viz. Obr. 3.28) a eluce 2 ml methanolu s následným vysoušením dusíkem po dobu 1 minuty (viz. Obr. 3.29). Jako nejlepší metoda eluce byla zvolena eluce dvakrát 2 ml methanolu, která měla účinnost 98%. Účinnosti extrakce ke každému zvolenému způsobu jsou shrnuty v Tab. 3.7. Vzorky byly měřeny v prostředí BR pufru o pH 4, kde OFL poskytuje nejvyšší signál.



**Obr. 3.27** DC voltamogramy OFL po SPE z 50 ml deionizované vody ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) a eluci 2 ml methanolu. v prostředí BR pufru o pH 4 (1) Slepý vzorek, (2) extrakt z vodného roztoku, (3) přímý přídavek OFL ke slepému vzorku.



**Obr. 3.28** DC voltamogramy OFL po SPE z 50 ml deionizované vody ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) a eluci dvakrát 2 ml methanolu. v prostředí BR pufru o pH 4 (1) Slepý vzorek, (2) extrakt z vodného roztoku, (3) přímý přídavek OFL ke slepému vzorku.



**Obr. 3.29** DC voltamogramy OFL po SPE z 50 ml deionizované vody ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) a eluci 2 ml methanolu a 1 minutě vysoušení dusíkem. v prostředí BR pufru o pH 4 (1) Slepý vzorek, (2) extrakt z vodného roztoku, (3) přímý přídavek OFL ke slepému vzorku.

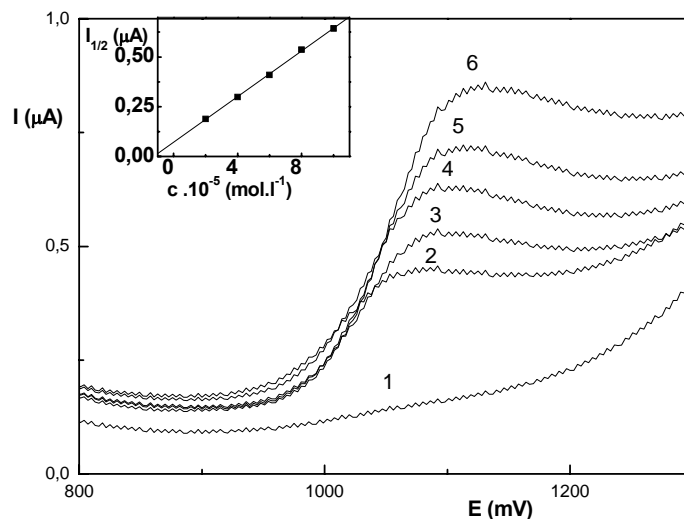
**Tab. 3.7** Účinnosti extrakce OFL po SPE z 50 ml deionizované vody různými způsoby eluce po doplnění BR pufrem o pH 4 na 10 ml metodou DCV na BDDFE.

<i>Způsoby eluce</i>	<i>Účinnost [%]</i>
Eluce 2 ml methanolu	90
Eluce dvakrát 2ml methanolu	98
Eluce 2 ml methanolu a 1 minutě vysoušení dusíkem	90

### 3.5.1 Stanovení ofloxacinu DC voltametrií po extrakci

Byl použit postup extrakce optimalizovaný v Kap. 3.5.1 (SPE z 50 ml vzorku, eluce dvakrát 2 ml methanolu do 10 ml odměrné baňky, doplnění BR pufrem o pH 4 po rysku a metoda DCV)

Kalibrační závislosti modelových vzorků deionizované vody obsahující OFL o objemu 50 ml byly proměřeny v koncentračním rozmezí  $(2-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ . Závislost výšky píku na koncentraci je lineární. Parametry kalibrační křivky a mez stanovitelnosti jsou uvedeny v Tab. 3.8. Odpovídající voltamogramy jsou pro ilustraci znázorněny na Obr. 3.30. Mez stanovitelnosti byla  $7 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ .



**Obr. 3.30** DC voltamogramy OFL po SPE z 50 ml deionizované vody a eluci dvakrát 2 ml methanolu po doplnění BR puřrem o pH 4 na 10 ml měřeno DCV na BDDFE.  $c$  (OFL): (1) 0; (2)  $2 \cdot 10^{-5}$ ; (3)  $4 \cdot 10^{-5}$ ; (4)  $6 \cdot 10^{-5}$ ; (5)  $8 \cdot 10^{-5}$ ; (6)  $1 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>. Na vloženém grafu je znázorněna závislost proudu vlny  $I_v$  na koncentraci v rozmezí  $(2 - 10) \cdot 10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup>.

**Tab. 3.8** Parametry kalibrační přímky pro stanovení OFL po SPE z 50 ml deionizované vody a eluci dvakrát 2 ml methanolu po doplnění BR puřrem o pH 4 na 10 ml metodou DCV na BDDFE.

Koncentrace [mol.l <sup>-1</sup> ]	Směrnice [nA.mol <sup>-1</sup> .l]	Úsek [nA]	Koef. korelace	LOQ [mol.l <sup>-1</sup> ]
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	$5,73 \cdot 10^6$	71,8	0,9997	$7 \cdot 10^{-6}$

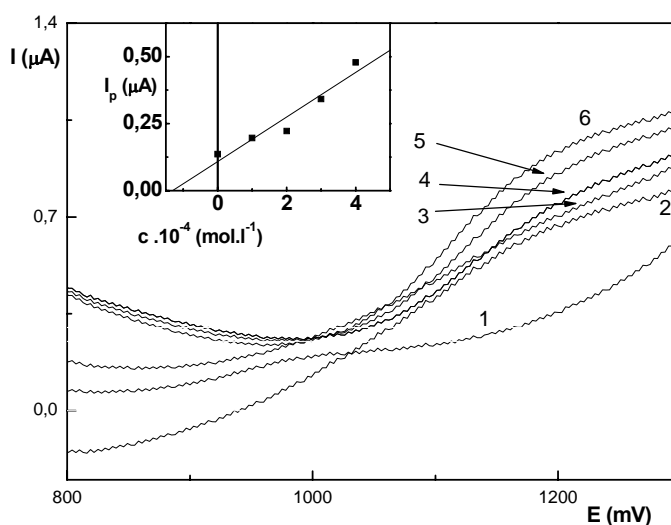
### 3.5.1.2 Voltametrické stanovení ofloxacinu v lidské moči po SPE

Pro stanovení koncentrace OFL v modelovém vzorku lidské moči byla použita metoda standardního přidavku. Vzorek byl analyzován po SPE 50 ml lidské moči metodou DCV na BDDFE v prostředí BR puřru o pH 4, kde poskytoval nejvyšší signál.

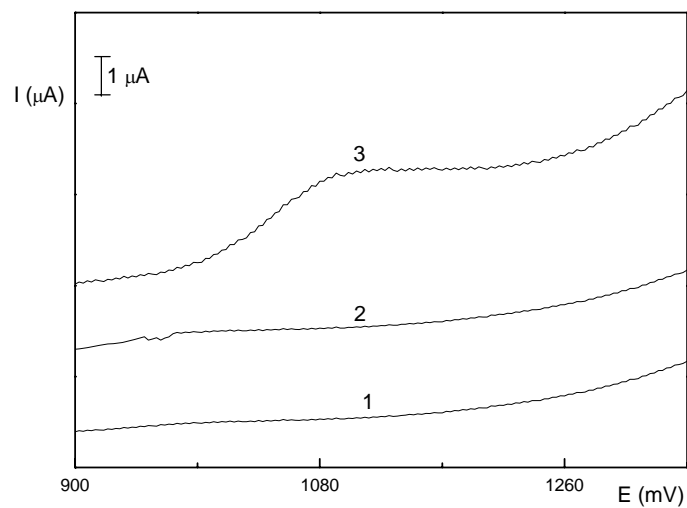
Koncentrace v modelovém vzorku moči měla být  $2,0 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>. Zjištěná koncentrace ve vzorku moči byla při DCV  $2,1 \pm 0,2 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>. Výtěžek byl  $105 \pm 10$  %.

Stanovené množství je uvedeno v Tab. 3.9 a na Obr. 3.31 jsou znázorněny DC voltamogramy OFL včetně příslušné koncentrační závislosti.

Vyvinutá metoda byla použita pro stanovení reálného vzorku lidské moči. Vzorek moči byl odebrán po požití dvou dávek tablet (1 dávka byla 100 mg OFL) v intervalu dvanácti hodin. Vzorek moči byl po předběžné separaci a prekoncentraci pomocí SPE z 50 ml lidské moči změřen pomocí metody DCV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH 4. Vzniklý voltamogram je znázorněn na Obr. 3.32. Koncentrace OFL v reálném vzorku moči určená opět metodou standardního přídávku byla  $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (29mg OFL) a odpovídá množství, které může být vylučováno organismem.



**Obr. 3.31** Voltamogramy OFL po SPE z 50 ml modelového vzorku lidské moči a eluci dvakrát 2 ml methanolu po doplnění BR pufrům o pH 4 na 10 ml měřeno DCV na BDDFE. (1) základní elektrolyt; (2) vzorek v základním elektrolytu; (3) vzorek s přídávkem OFL na koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ; (4) vzorek s přídávkem OFL na koncentraci  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ; (5) vzorek s přídávkem OFL na koncentraci  $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ; (6) vzorek s přídávkem OFL na koncentraci  $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Na vloženém grafu je znázorněno stanovení koncentrace OFL ve vzorku lidské moči metodou standardního přídávku.



**Obr. 3.32** DC voltamogram OFL po SPE z 50 ml reálného vzorku lidské moči a eluci dvakrát 2 ml methanolu po doplnění BR puřrem o pH 4 na 10 ml měřeno DCV na BDDFE. (1) základní elektrolyt (2) moč bez OFL; (3) moč po dvou dávkách tablet obsahujících OFL



## 4. Závěr

Byla vyvinuta metoda pro stanovení chloramfenikolu ve vzorku léčiva. Toto stanovení bylo provedeno metodou standardního přídatku v prostředí BR pufru o pH 6 metodami diferenční pulzní a DC voltametrie na borem dopované diamantové filmové elektrodě (BDDFE). Obě metody jsou pro toto stanovení přibližně stejně citlivé. Získané výsledky jsou shrnuty v Tab. 4.1.

Bylo zjištěno, že ofloxacin poskytuje při DC voltametii a diferenční pulzní voltametii na BDDFE v celé anodické oblasti potenciálů v prostředí BR pufru od pH 2 do pH 12 jednu vlnu či pík. Jako optimální bylo pro stanovení ofloxacinu zvoleno prostředí BR pufru o pH 4, kde látka má lineární závislost signálu na koncentraci v rozmezí od  $1 \cdot 10^{-4}$  do  $2 \cdot 10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> a od  $1 \cdot 10^{-5}$  do  $2 \cdot 10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup>. Měření jsou opakovatelná v celém sledovaném koncentračním rozsahu a nedochází při nich k pasivaci elektrody. Meze stanovitelnosti jsou shrnuty v Tab. 4.2. DC voltametrie je pro tuto látku citlivější než diferenční pulzní voltametrie.

Bylo zjištěno, že technika adsorpční rozpouštěcí voltametrie není využitelná, neboť ofloxacin se na BDDFE neakumuluje.

Byla vyvinuta metoda pro stanovení ofloxacinu ve vzorku léčiva. Toto stanovení bylo provedeno metodou standardního přídatku v prostředí BR pufru o pH 4 metodami diferenční pulzní a DC voltametrie na BDDFE. DC voltametrie je pro toto stanovení citlivější. Získané výsledky jsou shrnuty v Tab. 4.1.

Byly nalezeny podmínky pro stanovení ofloxacinu v deionizované vodě a v lidské moči pomocí DC voltametrie na borem dopované diamantové filmové elektrodě po jeho předběžné separaci a prekoncentraci extrakcí tuhou fází. Pro stanovení ofloxacinu v deionizované vodě byla zvolena metoda DC voltametrie, která poskytovala lineární závislosti v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-5}$  -  $1 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>. Mez stanovitelnosti je vyšší než u stanovení bez extrakce tuhou fází, je to asi proto, že u vyššího koncentračního řádu je opakovatelnost vzorků menší. Mez stanovitelnosti je v Tab. 4.2.

Pro stanovení ofloxacinu v lidské moči byla použita metoda standardního přídatku v prostředí BR pufru o pH 4 metodou DC voltametrie. Tato metoda byla použita pro stanovení modelových vzorků ofloxacinu v moči s účinností  $105 \pm 10\%$  i pro stanovení koncentrace v reálném vzorku. Získané výsledky jsou shrnuty v Tab. 4.1.

Na základě sledování spektrofotometrických křivek roztoku ofloxacinu uchovávaného ve tmě byla ověřena stabilita tohoto roztoku po dobu více než dvaceti dní.

**Tab. 4.1** Přehled účinností použitých metod při stanovení v reálných vzorcích

<i>Látka</i>	<i>Vzorek</i>	<i>Deklarovaný obsah [mol.l<sup>-1</sup>]</i>	<i>Metoda</i>	<i>Výtěžek [%]</i>	<i>Výtěžek Spektrofotometrie [%]</i>
CAP	Oční kapky	1,0.10 <sup>-4</sup>	DCV	92±7	99±3
	Spersadex comp.				
CAP	Oční kapky	2,7.10 <sup>-5</sup>	DPV	96±7	89±1
	Spersadex comp.				
OFL	Tablety	2,7.10 <sup>-5</sup>	DCV	100±1	89±1
	Zanocin 200				
OFL	Tablety		DPV	93±1	
	Zanocin 200				

**Tab. 4.2** Srovnání citlivosti vyvinutých metod pro stanovení OFL na BDDFE.

<i>Elektroda / technika</i>	<i>prostředí</i>	<i>LOQ [mol.l<sup>-1</sup>]</i>
BDDFE / DCV	BR pufr; pH 4	4.10 <sup>-7</sup>
BDDFE / DPV	BR pufr; pH 4	1.10 <sup>-6</sup>
BDDFE / DCV po SPE 50 ml roztoku OFL	BR pufr; pH 4	7.10 <sup>-6</sup>

## 5. Literatura

1. *Český lékopis 2005*. Grada Publishing a.s., Praha 2005.
2. Pudilová H.: Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha 2006. *Stanovení chloramfenikolu na uhlíkových pastových elektrodách*.
3. Hejzlar M.: *Antibiotika v praxi*. Makropulos, Praha 1995.
4. Xiao F., Zhao F. Q., Li J. W., Yan R., Yu J. J., Zeng B. Z.: *Anal. Chim. Acta* 596, 79 (2007). *Sensitive voltammetric determination of chloramphenicol by using single-wall carbon nanotube-gold nanoparticle-ionic liquid composite film modified glassy carbon electrodes*.
5. Wang L. L., Yang H., Zhang C. W., Mo Y. L., Lu X. H.: *Anal. Chim. Acta* 619, 54 (2008). *Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography*.
6. Baron S.: *Medical Microbiology*. The University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston 1996.
7. Agui L., Guzman A., Yanez-Sedeno P., Pingarron J. M.: *Anal. Chim. Acta* 461, 65 (2002). *Voltammetric determination of chloramphenicol in milk at electrochemically activated carbon fibre microelectrodes*.
8. *Léky a jejich použití*. Gemini, Bratislava 1993.
9. Collado M. S., Mantovani V. E., Goicoechea H. C., Olivieri A. C.: *Talanta* 52, 909 (2000). *Simultaneous spectrophotometric-multivariate calibration determination of several components of ophthalmic solutions: phenylephrine, chloramphenicol, antipyrine, methylparaben and thimerosal*.
10. Rejtharova M., Rejthar L.: *J. Chromatogr. A* 1216, 8246 (2009). *Determination of chloramphenicol in urine, feed water, milk and honey samples using molecular imprinted polymer clean-up*.
11. Bogialli S., Di Corcia A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 947 (2009). *Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin*.

12. Boscher A., Guignard C., Pellet T., Hoffmann L., Bohn T.: *J. Chromatogr. A* 1217, 6394 (2010). *Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.*
13. Mamani M. C. V., Reyes F. G. R., Rath S.: *Food Chem.* 117, 545 (2009). *Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD.*
14. Pajchel G., Michalska K., German R., Tyski S.: *Chromatographia* 68, 587 (2008). *Assay of the related compounds thiamphenicol, florphenicol, and chloramphenicol by CE.*
15. Barek J., Jandova K., Peckova K., Zima J.: *Talanta* 74, 421 (2007). *Voltammetric determination of aminobiphenyls at a boron-doped nanocrystalline diamond film electrode.*
16. Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B., Zima J.: *Electroanalysis* 19, 2003 (2007). *Nontraditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds.*
17. Thangadurai S., Shukla S. K., Anjaneyulu Y.: *Asian J. Chem.* 13, 1456 (2001). *Spectrophotometric determination of chloramphenicol in pure and pharmaceutical formulations.*
18. Wang L., Li Y. Q.: *Chromatographia* 70, 253 (2009). *Simultaneous Determination of Ten Antibiotic Residues in Milk by UPLC.*
19. Alemu H., Hlalele L.: *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 21, 1 (2007). *Voltammetric determination of chloramphenicol at electrochemically pretreated glassy carbon electrode.*
20. Yarnitzky C., Smyth W. F.: *Int. J. Pharm.* 75, 161 (1991). *Square-wave polarographic and voltametric analysis of selected electroreducible drugs.*
21. Chuanuwatanakul S., Chailapakul O., Motomizu S.: *Anal. Sci.* 24, 493 (2008). *Electrochemical analysis of chloramphenicol using boron-doped diamond electrode applied to a flow-injection system.*
22. Ječmínková J.: *Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha 2009. Voltametrické stanovení chloramfenikolu na borem dopované diamantové filmové elektrodě.*
23. Lee H. B., Peart T. E., Svoboda M. L.: *J. Chromatogr. A* 1139, 45 (2007). *Determination of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin in sewage by selective solid-phase extraction,*

- liquid chromatography with fluorescence detection, and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.*
24. Kapetanovic V., Milovanovic L., Erceg M.: *Talanta* 43, 2123 (1996). *Spectrophotometric and polarographic investigation of the ofloxacin-Cu(II) complexes.*
  25. Cheng G. W., Wu H. L., Huang Y. L.: *Anal. Chim. Acta* 616, 230 (2008). *Simultaneous determination of malondialdehyde and ofloxacin in plasma using an isocratic high-performance liquid chromatography/fluorescence detection system.*
  26. Ambrosi A., Antiochia R., Campanella L., Dragone R., Lavagnini I.: *J. Hazard. Mater.* 122, 219 (2005). *Electrochemical determination of pharmaceuticals in spiked water samples.*
  27. Huang X. G., Zhang H. S., Li Y. X., Li M. F.: *J. Chil. Chem. Soc.* 54, 204 (2009). *Simultaneous spectrophotometric determination of norfloxacin, ofloxacin and lomefloxacin in rabbit blood serum by use of chemometrics.*
  28. Tu Y. F., Liu L. B.: *Spectrosc. Spectr. Anal.* 20, 880 (2000). *The determination of ofloxacin by fluorescence spectrophotometry.*
  29. Canada-Canada F., Espinosa-Mansilla A., de la Pena A. M.: *J. Sep. Sci.* 30, 1242 (2007). *Separation of fifteen quinolones by high performance liquid chromatography: Application to pharmaceuticals and ofloxacin determination in urine.*
  30. Qin W. D., Liu Q. C., Fan Y. X.: *J. Sep. Sci.* 32, 118 (2009). *CE determination of quinolones in the presence of bovine serum albumin.*
  31. Ensaifi A. A., Khayamian T., Taei M.: *Talanta* 78, 942 (2009). *Determination of ultra trace amount of enrofloxacin by adsorptive cathodic stripping voltammetry using copper(II) as an intermediate.*
  32. Zhang Z. Q., Li Y. F., He X. M., Zhang H.: *Talanta* 43, 635 (1996). *Electroanalytical characteristics of enoxacin and their analytical application.*
  33. Huang K. J., Liu X., Xie W. Z., Yuan H. X.: *Microchim. Acta* 162, 227 (2008). *Voltammetric behavior of ofloxacin and its determination using a multi-walled carbon nanotubes-Nafion film coated electrode.*
  34. Yang C. H., Xu Y. X., Hu C. G., Hu S. S.: *Electroanalysis* 20, 144 (2008). *Voltammetric detection of ofloxacin in human urine at a Congo red functionalized water-soluble carbon nanotube film electrode.*

35. Cizek K., Berek J., Fischer J., Peckova K., Zima J.: *Electroanalysis* 19, 1295 (2007). *Voltammetric determination of 3-nitrofluoranthene and 3-aminofluoranthene at boron doped diamond thin-film electrode.*
36. Sarigul T., Inam R., Aboul-Enein H. Y.: *Talanta* 82, 1814 (2010). *Electro-oxidation of herbicide halosulfuron methyl on glassy carbon electrode and applications.*
37. Ding C. F., Zhao F., Ren R., Lin J. M.: *Talanta* 78, 1148 (2009). *An electrochemical biosensor for alpha-fetoprotein based on carbon paste electrode constructed of room temperature ionic liquid and gold nanoparticles.*
38. Berek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B.: *Sensors* 6, 445 (2006). *Silver solid amalgam electrodes as sensors for chemical carcinogens.*
39. Fossdal K., Jacobsen E.: *Anal. Chim. Acta* 56, 105 (1971). *Polarographic determination of chloramphenicol.*
40. Lund H., Hammerich O.: *Organic Electrochemistry: An Introduction and a Guide*. Fourth edition, Revised and Expanded ed., Marcel Dekker, New York 2001.
41. May P. W.: *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. A-Math. Phys. Eng. Sci.* 358, 473 (2000). *Diamond thin films: a 21st-century material.*
42. Swain G. M., Ramesham R.: *Anal. Chem.* 65, 345 (1993). *The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline diamond thin-film electrodes.*
43. Jones S. E. W., Compton R. G.: *Curr. Anal. Chem.* 4, 170 (2008). *Stripping analysis using boron-doped diamond electrodes.*
44. Preechaworapun A., Chuanuwatanakul S., Einaga Y., Grudpan K., Motomizu S., Chailapakul O.: *Talanta* 68, 1726 (2006). *Electroanalysis of sulfonamides by flow injection system/high-performance liquid chromatography coupled with amperometric detection using boron-doped diamond electrode.*
45. Pleskov Y. V., Sakharova A. Y., Krotova M. D., Bouilov L. L., Spitsyn B. V.: *J. Electroanal. Chem.* 228, 19 (1987). *Photoelectrochemical püroperties of semiconductor diamond.*
46. Ribeiro F. W. P., Cardoso A. S., Portela R. R., Lima J. E. S., Machado S. A. S., de Lima P., De Souza D., Correia A. N.: *Electroanalysis* 20, 2031 (2008). *Electroanalytical determination of promethazine hydrochloride in pharmaceutical formulations on highly boron-doped diamond electrodes using square-wave adsorptive voltammetry.*

47. Simon N., Girard H., Manesse M., Ballutaud D., Etcheberry A.: *Diam. Relat. Mat.* *17*, 1371 (2008). *Electrochemical preconditioning of moderately boron doped diamond electrodes: Effect of annealing.*
48. Almeida E. C., Baldan M. R., Rosolen J. M., Ferreira N. G.: *Diam. Relat. Mat.* *17*, 1529 (2008). *Impedance characteristics of the diamond/carbon fiber electrodes for electrical double-layer capacitor.*
49. Xiao L., Streeter I., Wildgoose G. G., Compton R. G.: *Sens. Actuator B-Chem.* *133*, 118 (2008). *Fabricating random arrays of boron doped diamond nano-disc electrodes: Towards achieving maximum Faradaic current with minimum capacitive charging.*
50. Gao Y. F., Chen X. H., Gupta S., Gillis K. D., Gangopadhyay S.: *Biomed. Microdevices* *10*, 623 (2008). *Magnetron sputtered diamond-like carbon microelectrodes for on-chip measurement of quantal catecholamine release from cells.*
51. Inczedy J. L. T., Ure A. M, (Ed.): *Compendium of Analytical Nomenclature (Definitive Rules 1997)*. Santa Fe, USA, 1998.