

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Hana Axmannová

STANOVENÍ METRONIDAZOLU NA MODIFIKOVANÉ
UHLÍKOVÉ PASTOVÉ ELEKTRODĚ

Determination of Metronidazole on Modified Carbon Paste
Electrode

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Hana Dejmková

Praha 2013

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 10. 5. 2013

Ráda bych poděkovala Mgr. Haně Dejmkové za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat všem kolegům z laboratoře 112, kteří vytvořili příjemné a přátelské prostředí. V neposlední řadě musím poděkovat svým rodičům, jelikož bez jejich finanční i psychické podpory bych nemohla studovat vysokou školu.

Klíčová slova:

Diferenční pulzní voltametrie

Uhlíková pastová elektroda

Metronidazol

Potlačení redukce kyslíku

Key words:

Differential pulse voltammetry

Carbon paste electrode

Metronidazole

Suppression of oxygen reduction

Abstrakt

V této bakalářské práci byla zkoumána možnost potlačení odezvy kyslíku na uhlíkové pastové elektrodě pomocí modifikace elektrody přídavkem redukčního činidla. Jako modifikátory byly zvoleny dvě látky: siřičitan sodný a fosforan sodný. K porovnání byla použita uhlíková pastová elektroda bez modifikace. Možnost využití vyvinutých elektrod byla ověřena prostřednictvím stanovení metronidazolu metodou diferenční pulzní voltametrie.

Byly optimalizovány podmínky pro stanovení metronidazolu: ze závislosti výšky píků na pH bylo zvoleno pro nemodifikovanou uhlíkovou pastovou elektrodu (CPE) optimální pH 10, pro siřičitanem modifikovanou elektrodu (S-CPE) pH 7 a pro fosforanem modifikovanou elektrodu (F-CPE) pH 4. Ve vybraných prostředích byly změřeny koncentrační závislosti, ze kterých byly určeny meze detekce a stanovitelnosti pro dané elektrody. Byla zkoumána možnost zvýšit citlivost stanovení pomocí akumulčního kroku, ale akumulace metronidazolu nebyla pozorována ani po 5 minutách.

Meze detekce a stanovitelnosti pro CPE byly $1,7 \times 10^{-5}$ mol/l a $5,6 \times 10^{-5}$ mol/l. Pro S-CPE byly tyto hodnoty $6,8 \times 10^{-5}$ mol/l a $2,3 \times 10^{-4}$ mol/l a pro F-CPE $1,3 \times 10^{-5}$ mol/l a $4,3 \times 10^{-5}$ mol/l.

Vyvinutá metoda stanovení byla prověřena stanovením metronidazolu v reálném vzorku tablety Entizol s obsahem 250 mg metronidazolu. Obsah analytu byl stanoven metodou standardního přídavku. Jako referenční metoda byla použita vysoko-účinná kapalinová chromatografie s obrácenou fází (RP-HPLC). Největší shodu s deklarovanou hodnotou obsahu metronidazolu v tabletě vykazovalo stanovení pomocí F-CPE, naopak nejmenší shodu vykazovalo měření pomocí CPE.

Abstract

This bachelor thesis examines the possibilities of suppression of the oxygen signal of carbon paste electrode by modification of the electrode with a reductant. Two modifiers were chosen: sodium sulphite and sodium hypophosphite. The unmodified carbon paste electrode was used for the comparison. The possibilities of using these developed electrodes were verified via determination of metronidazole by the differential pulse voltammetry.

The conditions for the determination of metronidazole were optimized; for unmodified carbon paste electrode (CPE) buffer of pH 10 was selected as the optimum medium, for carbon paste electrode modified with sodium sulphite (S-CPE) buffer of pH 7 was selected, and finally for carbon paste electrode modified with sodium hypophosphite (F-CPE) buffer of pH 4 was selected as the optimum medium. In this media, concentration dependences were measured and detection and quantification limits were obtained. The possibility of increase of the sensitivity of determination by the accumulation step was studied, but the accumulation of metronidazole was not observed after 5 minutes.

The detection and quantification limits for CPE were $1,7 \times 10^{-5}$ mol/l and $5,6 \times 10^{-5}$ mol/l, for S-CPE $6,8 \times 10^{-5}$ mol/l and $2,3 \times 10^{-4}$ mol/l and finally for F-CPE $1,3 \times 10^{-5}$ mol/l and $4,3 \times 10^{-5}$ mol/l.

The developed methods of determination of metronidazole were then verified by its determination in the real sample of Entizol tablets containing 250 mg of metronidazole. Concentration of the analyte was determined by standard addition method and then compared with reversed phase high- performance liquid chromatography (RP-HPLC) also using the standard addition method. The best consensus with the declared amount of metronidazole in tablet form was found using the F-CPE, in contrary the worst consensus was found using the CPE.

OBSAH:

1. TEORETICKÁ ČÁST	9
1.1 Cíl práce.....	9
1.2 Studovaná látka.....	9
1.3 Způsoby stanovení metronidazolu.....	10
1.4 Uhlíková pastová elektroda.....	11
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	14
2.1 Studovaná látka.....	14
2.2 Použité chemikálie.....	14
2.3 Použitá aparatura.....	15
2.4 Další používaná zařízení.....	16
2.5 Pracovní postupy.....	16
2.5.1 Optimalizace měření.....	16
2.5.2 Vzorky tablet.....	17
2.6 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku.....	17
3. VÝSLEDKY A DISKUZE	19
3.1 Modifikace uhlíkové pasty.....	19
3.2 Optimalizace pH prostředí.....	22
3.2 Optimalizace množství modifikátoru.....	24
3.3 Ověření možnosti akumulace.....	26
3.4 Koncentrační závislost.....	27
3.4.1 Kalibrační závislost měřená pomocí CPE.....	27
3.4.2 Kalibrační závislost měřená pomocí S-CPE.....	29
3.4.3 Kalibrační závislost měřená pomocí F-CPE.....	31
3.4.4 Porovnání kalibračních závislostí.....	33
3.5 Stanovení metronidazolu ve vzorku tablety.....	33
3.5.1 Stanovení metronidazolu ve vzorku tablety pomocí DPV.....	33
3.5.2 Stanovení metronidazolu ve vzorku tablety pomocí HPLC.....	37
3.5.3 Porovnání výsledků měření vzorků tablet.....	38
4. ZÁVĚR	40
5. POUŽITÁ LITERATURA	41

Seznam použitých zkratk:

A	absorbance
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
CPE	uhlíková pastová elektroda (carbon paste electrode)
S-CPE	uhlíková pastová elektroda s přídavkem siřičitanu sodného
F-CPE	uhlíková pastová elektroda s přídavkem fosforanu sodného
DCV	přímá voltametrie (direct current voltammetry)
DPV	diferenční pulzní voltametrie (differential pulse voltammetry)
E_p	elektrický potenciál píku
I_p	elektrický proud píku
λ	vlnová délka
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
p.a.	pro analýzu
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
R	korelační koeficient
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (reversed phase-high performance liquid chromatography)
s	směrodatná odchylka [mg]
t	čas
x	střední hodnota obsahu analytu [mg]
$x_{deklarovaná}$	deklarovaná hodnota obsahu analytu v tabletě Entizolu [mg]
x_{HPLC}	střední hodnota obsahu analytu zjištěná metodou RP-HPLC [mg]

1. Teoretická část

1.1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je studium modifikace uhlíkových pastových elektrod vhodnými redukčními činidly s cílem omezit vliv kyslíku rozpuštěného v pastě a porovnání těchto elektrod s nemodifikovanou uhlíkovou pastovou elektrodou prostřednictvím vývoje metody pro stanovení metronidazolu, látky používané jako antibiotikum například proti bakteriální vaginóze, pomocí diferenční pulzní voltametrie. Získané výsledky byly použity ke stanovení metronidazolu ve farmaceutickém vzorku tablet Entizol s obsahem metronidazolu 250 mg.

1.2 Studovaná látka

Metronidazol je derivát nitroimidazolu, léčivá látka vykazující antibakteriální i antiprotozoální účinky, používaná od roku 1959 k léčbě infekcí způsobených *Trichomonas vaginalis*. Kromě tohoto mikroorganismu působí i proti *Gardnerella vaginalis*, *Entamoeba histiolytica*, proti gramnegativním tyčinkám *Bacteroides fragilis* a grampozitivním tyčinkám *Eubacterium* a *Clostridium* [1].

Díky těmto účinkům se používá především k léčbě bakteriální vaginózy. Jedná se o nepříjemné onemocnění ženského pohlavního orgánu, které může vést k chronickému pánevnímu zánětu, potratu nebo předčasnému porodu. Vaginální prostředí je typicky kyselé v důsledku osídlení laktobacily. Pokud dojde k poklesu množství laktobacilů v pochvě, mohou se začít množit patogenní bakterie [2,3].

Mezi vedlejší účinky způsobené metronidazolem se řadí neutropenie (snížený počet neutrofilů), gastrointestinální poruchy, pálení při močení a ztmavnutí moči. Vedlejší účinky nervového systému jsou ataxie, závrať, periferní neuropatie a bolesti hlavy. Nejzávažnějším problémem je mutagenita a karcinogenita, metronidazol byl zařazen na seznam možných karcinogenů již v roce 1985 kvůli zvýšenému výskytu nádorů u myší

a krys. V následných studiích na lidech byl prokázán zvýšený výskyt rakoviny plic u žen léčených metronidazolem. Je zajímavé, že i přesto se tato látka stále používá [1,4].

Metronidazol je dobře vstřebáván všemi tkáněmi, putuje do krve, mozku, žluči, mozkomíšní tekutiny, mateřského mléka i placenty. Metabolizuje se v játrech hydroxylací, oxidací postranního řetězce a konjugací s kyselinou glukuronovou. Vylučování metronidazolu je zprostředkováno z větší části ledvinami (60-80 %), dále pak vylučováním do stolice (6-15 %) [1,5].

1.3 Způsoby stanovení metronidazolu

Metronidazol se stanovuje různými metodami, především chromatograficky, elektrochemicky nebo spektrofotometricky.

Typickým příkladem chromatografického stanovení metronidazolu bylo stanovení metodou RP-HPLC s UV detekcí při 254 nm, kde byla použita kolona μ -Bondapak C-18 a jako mobilní fáze směs methanol:voda (40:60, V/V). Bylo měřeno s pomocí sulfamethoxazolu jako vnitřního standardu. Bylo dosaženo lineární kalibrační křivky v rozmezí koncentrací 10-70 $\mu\text{g/ml}$, mez detekce a mez stanovitelnosti byly určeny na hodnoty 0,33 $\mu\text{g/ml}$ a 1,11 $\mu\text{g/ml}$ [6].

Z poslední doby můžeme jmenovat také chromatografické stanovení nitroimidazolů v šesti různých matricích, které bylo provedeno pomocí kapalinové chromatografie v tandemu s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Všechny vzorky byly přečištěny pomocí extrakce na pevné fázi (SPE) za použití Strata-SDB kolonek. K analýze byla použita HPLC kolona Kinetex XB C-18 typu core-shell (100 mm \times 3 mm, 2,6 μm), separace probíhala izokraticky s mobilní fází tvořenou 0,1% kyselinou mravenčí ve směsi voda:methanol (88:12, V/V, pH 2,6) při průtokové rychlosti 0,7 ml/min. Pro metronidazol byly meze stanovitelnosti a detekce 0,33 $\mu\text{g/kg}$ a 0,1 $\mu\text{g/kg}$ [7].

Ze spektrometrických metod stanovení metronidazolu můžeme jmenovat nukleární magnetickou rezonanci (NMR). V tomto případě bylo použito protonového NMR

spektrometru typu 300 MHz, JEOL-NM-LA300 FT-NMR s kyselinou maleinovou jako interním standardem a DMSO- d_6 jako rozpouštědlem. Výtěžek metronidazolu byl v rozmezí 98,06-100,46 % s průměrnou odchylkou 0,45 %. Byla naměřena koncentrační závislost v rozmezí 0,92–170 mg/0,6 ml DMSO- d_6 [8].

Při elektrochemických metodách se v případě metronidazolu využívá redukce nitroskupiny na odpovídající hydroxylamin. Jedno z takovýchto stanovení bylo provedeno pomocí elektrody ze skelného uhlíku aktivované nanesením vrstvy aluminu metodou přímé voltametrie (DCV) v prostředí BR pufru o pH 10. Koncentrační závislost byla lineární v rozsahu koncentrací 2×10^{-6} – 6×10^{-4} mol/l, mez detekce byla určena na hodnotu $1,1 \times 10^{-6}$ mol/l [9].

Při nedávném elektrochemickém stanovení metronidazolu byla použita méně obvyklá elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná kompozitem složeným z grafenu a iontové kapaliny. K měření byla použita diferenční pulzní voltametrie (DPV) v prostředí fosfátového pufru o pH 7. Kalibrační závislost byla lineární v rozsahu koncentrací 1×10^{-7} – $2,5 \times 10^{-5}$ mol/l. Mez detekce byla určena jako $4,7 \times 10^{-8}$ mol/l [10].

1.4 Uhlíková pastová elektroda

Uhlíková pastová elektroda (CPE) byla objevena v roce 1958 R. Adamsem, který původně hledal alternativu ke rtuťové kapkové elektrodě (DME) [11].

Uhlíková pastová elektroda se skládá ze dvou hlavních komponent, jimiž jsou uhlíkový prášek a organické pojivo. Jako pojivo se nejčastěji používá minerální, parafínový nebo silikonový olej, neboť splňují základní požadavky: jsou nerozpustné a chemicky neaktivní v měřeném roztoku, jsou netěkavé, stabilní a s dlouhou životností. Jako uhlíkový prášek se nejčastěji využívá grafit nebo mikročástice skelného uhlíku, neboť mají stejnou velikost částic, nízkou schopnost absorpce a jsou chemicky čisté [12,13].

Po smíchání obou těchto složek v třecí misce je důležité nechat danou směs stabilizovat, protože pokud není směs dostatečně ustálená, může docházet ke změnám v chování

elektrody. Takto připravenou uhlíkovou pastou se dále plní tělo elektrody, které je často vyrobeno z teflonu nebo polyethylenu a je opatřeno pístem ke snadnému vytlačení použité pasty a k rychlému obnovení povrchu elektrody [12,14].

Vlastnosti uhlíkové pastové elektrody jsou srovnatelné s vlastnostmi pevných elektrod, jedná se především o hydrofobitu, nízký odpor a nízký proud pozadí. Pokud chceme pozměnit vlastnosti CPE, můžeme (kromě výměny jedné ze dvou základních složek) do pasty přidat nějaký modifikátor, takto upravené elektrody se nazývají modifikované uhlíkové pastové elektrody (MCPE) [15].

Modifikace elektrod má už dlouhou tradici – původní Adamsovu elektrodu upravil například T. Kuwana, který zavedl do pastového materiálu chemicky aktivní látku, ferrocen, antrachinon nebo 5-aminobenzofenon [16]. Další úpravu provedl R. P. Baldwin, který do pasty přimíchal další látky, aby upravil její vlastnosti. Konkrétně využil schopnosti prekoncentrace, kdy použil 2,11-dimethyl-1,10-fenanthrolin k akumulaci měďných iontů na povrchu CPE [17].

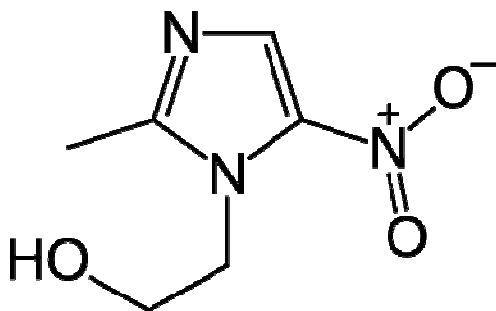
Obsah modifikující látky je většinou v rozmezí do 30% (w/w) a způsobů jak upravit uhlíkovou pastu několik. Prvním způsobem je rozpuštění modifikátoru v kapalné složce pasty, další možností je přimíchat modifikátor do pasty během procesu homogenizace, v neposlední řadě je také možno napustit grafitový prášek roztokem obsahujícím modifikátor a nechat jej odpařit; tento postup se nazývá impregnace grafitu [13].

Jednou z mnoha zmíněných výhod CPE je velmi nízký zbytkový proud při měření v anodické oblasti potenciálů, bohužel při použití v katodické oblasti vzniká při měření rušivý signál, který je způsoben redukcí rozpuštěného kyslíku v pastě. Takto narušená elektroda může vykazovat zvláštní chování. Kyslík se nachází v obou složkách pasty, rozpuštěný v pastovací kapalině nebo sorbovaný na povrchu uhlíkových částic. Z pórů uhlíku může být odstraněn několika způsoby. Při velmi vysokých teplotách nebo evakuací za pokojové teploty může být vyloučen ve formě oxidů [18].

Při zkoumání vlivu složení pasty na obsah kyslíku bylo zjištěno, že druh použitého pojiva ovlivňuje tvar katodické křivky. Zatímco pasta připravená smícháním grafitu s běžně používaným silikonovým nebo minerálním olejem vykazovala vyšší obsah kyslíku (podle základní linie), pasta připravená také z grafitu ale s použitím trikresylfosfátu (TCP) měla obsah kyslíku mnohem menší [19]. Další možností vytěsnění kyslíku z pasty je probublání roztoku, ve kterém je elektroda ponořena, argonem nebo jiným inertním plynem [19].

2. Experimentální část

2.1 Studovaná látka



Obr. 1

Strukturní vzorec metronidazolu

C.A.S. název: 2-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)ethanol

C.A.S. číslo: 443-48-1

Sumární vzorec: C₆H₉N₃O₃

Molární hmotnost: 171,16 g/mol

Bod tání: 159-163°C

Fyzikální stav: bílá až žlutá krystalická látka

Další používaná jména: Flagyl, Filmet

2.2 Použité chemikálie

Studovanou látkou byl 2-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)ethanol (metronidazol), viz Obr. 1. Zásobní roztok metronidazolu (Sigma-Aldrich) o koncentraci 1×10^{-3} mol/l byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v destilované vodě. Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány pipetováním přesného objemu zásobního roztoku a jeho následného ředění Brittonovým-Robinsonovým pufrem (BR pufrem) k dosažení potřebné koncentrace.

Zásobní roztok byl uchován v chladu a temnu.

Brittonův-Robinsonův pufr byl připraven smícháním dvou základních složek, složky kyselá se zásaditou. Zásaditou složku tvořil vodný roztok hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika) o koncentraci 0,2 mol/l. Druhým základním roztokem byla kyselá složka připravená smícháním kyseliny octové (99%, p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika), kyseliny fosforečné (85%, p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika) a kyseliny borité (p.a., Lachema, Brno, Česká republika), každé na koncentraci 0,04 mol/l.

Uhlíková pasta pro plnění elektrody byla připravena zhomogenizováním 250 mg grafitu (Grafit Týn, Česká republika) s 0,1 ml minerálního oleje (Sigma-Aldrich). Modifikovaná uhlíková pasta obsahovala siřičitan sodný (p.a., Lachema, Brno, Česká republika), druhá modifikovaná pasta obsahovala fosforan sodný (p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika). Udávaný přírůstek modifikátoru je vztažen k hmotnosti grafitu a představuje přírůstek k jeho základnímu množství.

2.3 Použitá aparatura

Pro voltametrická měření byl použit Eco Tribo polarograf, Software Polar Pro v. 5.1 (Polaro-Sensors, Praha).

Byly používány celkem tři pracovní elektrody na bázi uhlíkové pasty. První elektroda byla nemodifikovaná uhlíková pastová elektroda (CPE), druhá byla uhlíková pastová elektroda s přírůstkem fosforanu sodného (F-CPE) a třetí byla uhlíková pastová elektroda s přírůstkem siřičitanu sodného (S-CPE), vše v teflonovém pouzdře s aktivní plochou 2 mm. Jako referentní byla použita argentchloridová elektroda s 3 mol/l KCl (ECO-Trend, Česká republika) a jako pomocná platinová plíšková elektroda (ECO-Trend, Česká republika).

Ke stanovení metodou RP-HPLC byla použita sestava, ve které byla k pohánění mobilní fáze do systému použita gradientová pumpa Beta 10 (Ecom, Česká republika) a k odplynění mobilní fáze byl použit degasser DG 4014 (Ecom, Česká republika). Dávkování probíhalo pomocí dávkovače se smyčkou o objemu 20 μ l (Ecom, Česká

republika). Stanovení probíhalo na koloně Kromasil C18 (250 mm x 4,6 mm) s částicemi o průměru 5 μm a analyt byl detekován UV-VIS spektrofotometrickým detektorem Sapphire 600 (Ecom, Česká republika). Všechna data byla sbírána programem Clarity Chromatography Station (DataApex, Praha, Česká republika) pracujícím v prostředí Windows XP (Microsoft, USA).

2.4 Další používaná zařízení

pH metr: Jenway 3510 (Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou;

Spektrofotometr: Agilent 8453 (Agilent, USA).

2.5 Pracovní postupy

2.5.1 Optimalizace měření

Vzorek byl připraven odpipetováním přesného množství zásobního roztoku do 10ml odměrné baňky a doplněn po rysku BR puřem, roztok byl promíchán a poté převeden do voltametrické nádoby. Roztok byl před začátkem měření 5 minut probublán dusíkem pro odstranění kyslíku z roztoku.

Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty a to nejméně ve třech opakováních.

Nastavení parametrů pro DPV bylo následovné: rychlost polarizace 20 mV/s, výška pulzu -50 mV, šířka pulzu 100 ms, křivky byly měřeny v potenciálovém rozsahu 0 až -1000 mV.

Při měření kalibrační závislosti byly hodnoty zpracovány metodou lineární regrese, mez detekce a stanovitelnosti pak byla vypočítána jako trojnásobek, respektive desetinásobek poměru směrodatné odchylky nejnižšího změřitelného signálu rozlišitelného od šumu a směrnice kalibrační křivky.

Obsahu metronidazolu ve vzorcích byl stanovován ve třech tabletách, jeho obsah byl vyjádřen jako střední hodnota a rozptyl pomocí směrodatné odchylky.

2.5.2 Vzorky tablet

Jako reálný vzorek byly použity tablety Entizol (Zakłady Farmaceutyczne Polpharma S.A., Starogard, Polsko) obsahující metronidazol jako účinnou látku. Vzorky byly připraveny rozdrčením tablety v třecí misce a převedením do 250ml odměrných baněk, poté byly baňky doplněny po rysku destilovanou vodou a promíchány. Baňky byly vloženy do ultrazvuku a sonikovány 5 minut. Z takto připravených roztoků bylo následně odebráno 0,5 ml do 10ml odměrné baňky a doplněno po rysku BR pufrem o požadovaném pH a poté opět promícháno. Z odměrné baňky byl roztok převeden do voltametrické nádoby pro měření, roztok byl před měřením vždy 5 minut probublán dusíkem.

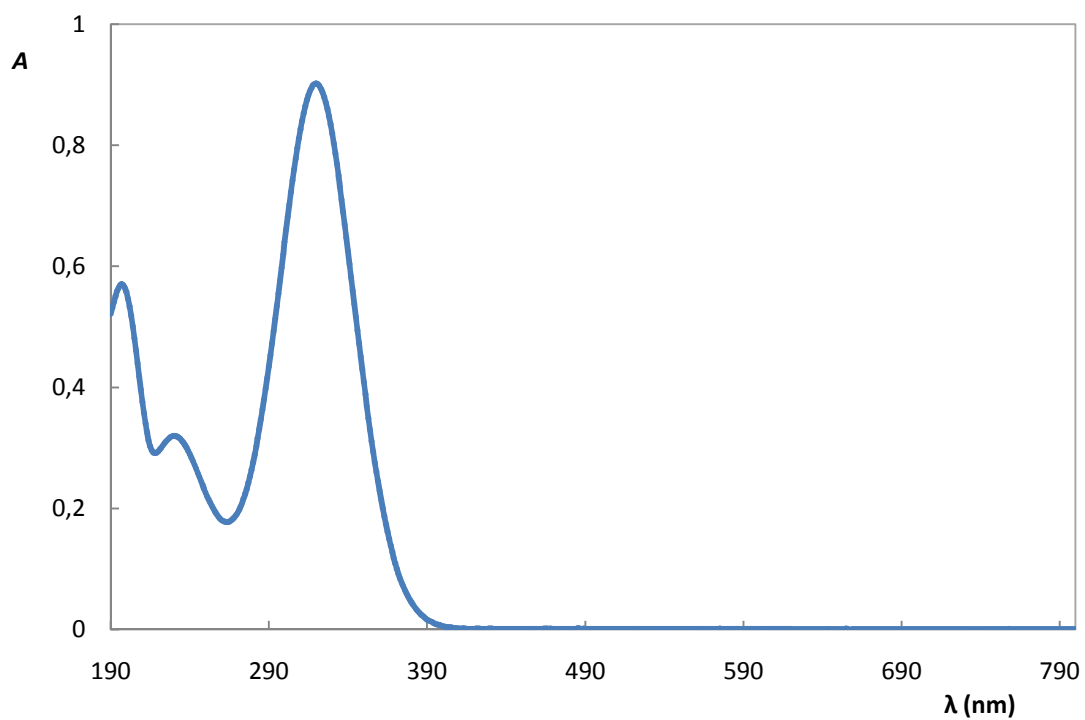
Ke stanovení pomocí HPLC byl po sonikaci vzorek rozpuštěné tablety přefiltrován pomocí stříkačkového filtru ProFill PVDF/0,45 μm (Fischer Scientific), z takto přečištěného roztoku bylo odebráno 0,5 ml, byly přidány 4 ml methanolu (gradient grade for chromatography, LiChrosolv®, Merck, Německo) a nakonec bylo doplněno po rysku destilovanou vodou. Roztoky se standardním přídatkem obsahovaly navíc buď 200 μl , nebo 400 μl (1. a 2. přídatkem) standardu o koncentraci 5×10^{-3} mol/l, byl přidán methanol a až poté byl roztok doplněn destilovanou vodou po rysku.

2.6 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku

Stálost zásobního roztoku o koncentraci 1×10^{-3} mol/l byla studována spektrofotometricky. Absorpční spektrum bylo měřeno v 1mm kyvetě proti destilované vodě v rozsahu vlnových délek 190-800 nm (Obr. 2). Absorbance metronidazolu byla sledována po dobu 3 měsíců. Z průběhu jednotlivých křivek vyplývá, že je zásobní roztok stabilní v temnu a chladu alespoň po tuto dobu. Naměřené hodnoty absorbancí jsou uvedeny v Tab. I.

Tab. I: Naměřené hodnoty absorbancí zásobního roztoku metronidazolu

t (dny)	A ($\lambda=197$ nm)	A ($\lambda=230$ nm)	A ($\lambda=320$ nm)
1	0,570	0,320	0,902
30	0,573	0,318	0,900
90	0,574	0,318	0,900



Obr. 2

UV-VIS spektrum zásobního roztoku metronidazolu o koncentraci 1×10^{-3} mol/l, měřeno v 1mm kyvetě proti destilované vodě.

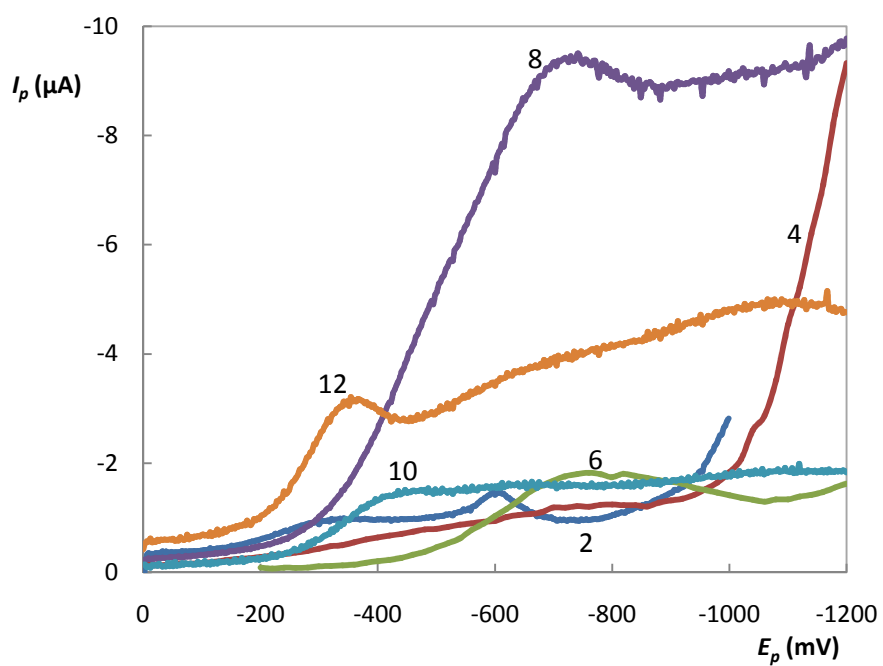
3. Výsledky a diskuze

3.1 Modifikace uhlíkové pasty

Při měření v katodické oblasti dochází k redukci kyslíku, který je taktéž obsažen v roztoku. Proto byly zkoumány elektrody s příměsí redukčního činidla, aby k redukci kyslíku docházelo chemicky a ne elektrochemicky. Do uhlíkových past byl tedy přimíchán siřičitan sodný a fosforan sodný. Chování takto upravených past bylo zkoumáno v prostředí o různých hodnotách pH.

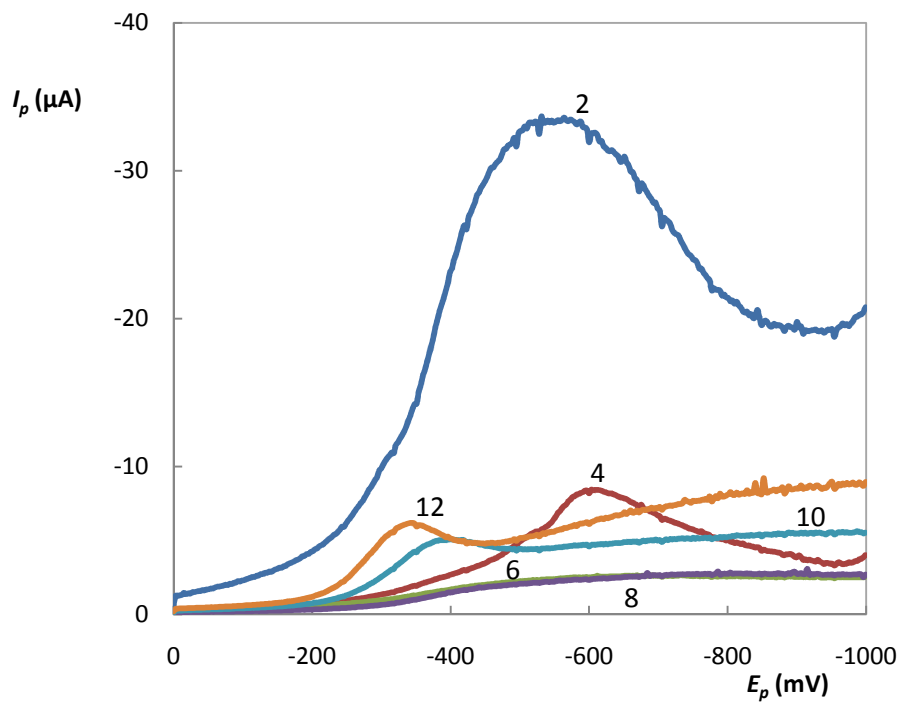
Na trojici past (CPE, S-CPE a F-CPE) byly změřeny křivky základního elektrolytu (BR pufr) o různých hodnotách pH, aby se zjistilo, jestli v případě přimíchání modifikátorů zmizí vlna kyslíku.

Z Obr. 3 je patrné, že při měření nemodifikovanou elektrodou se objevuje vlna kyslíku. Potlačení kyslíku probíhá u S-CPE v neutrální oblasti (Obr. 4); v kyselých prostředích je pozorovatelný nápadný pík, zřejmě zde probíhá nějaká vedlejší reakce siřičitanu, zejména v prostředí o pH 2. Naopak v zásaditých oblastech se potlačení kyslíku dostatečně neprojevílo. Pro F-CPE bylo zvoleno pH 4, protože křivky měly nejlepší průběh v kyselých oblastech pH (Obr. 5). V zásaditých oblastech křivka začíná ve vyšších hodnotách proudu, což není vhodné, jelikož při nízkých koncentracích se analyt může skrýt.



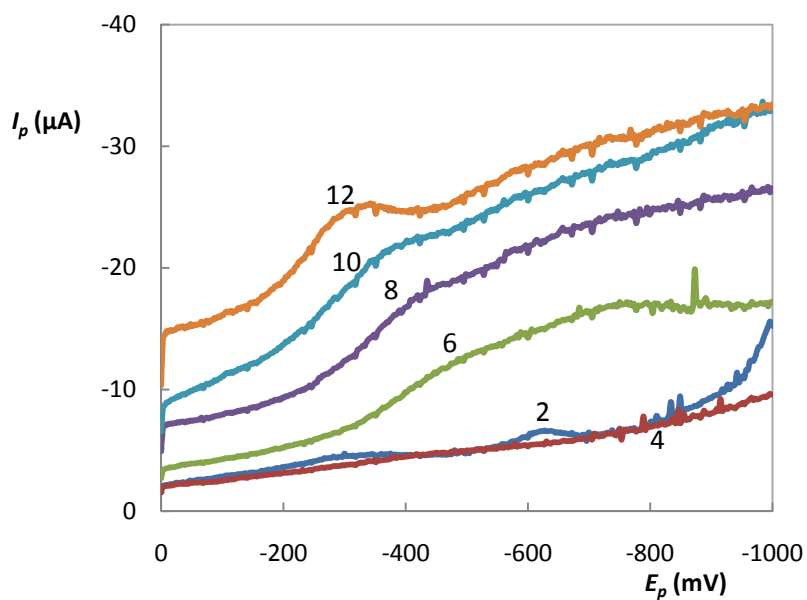
Obr. 3

DP voltamogramy základního elektrolytu (BR pufr) měřeny pomocí CPE, pH pufru je naznačeno u křivky.



Obr. 4

DP voltamogramy základního elektrolytu (BR pufr) o různých hodnotách pH, měřeno pomocí S-CPE. Hodnoty pH jsou uvedeny u křivky.



Obr. 5

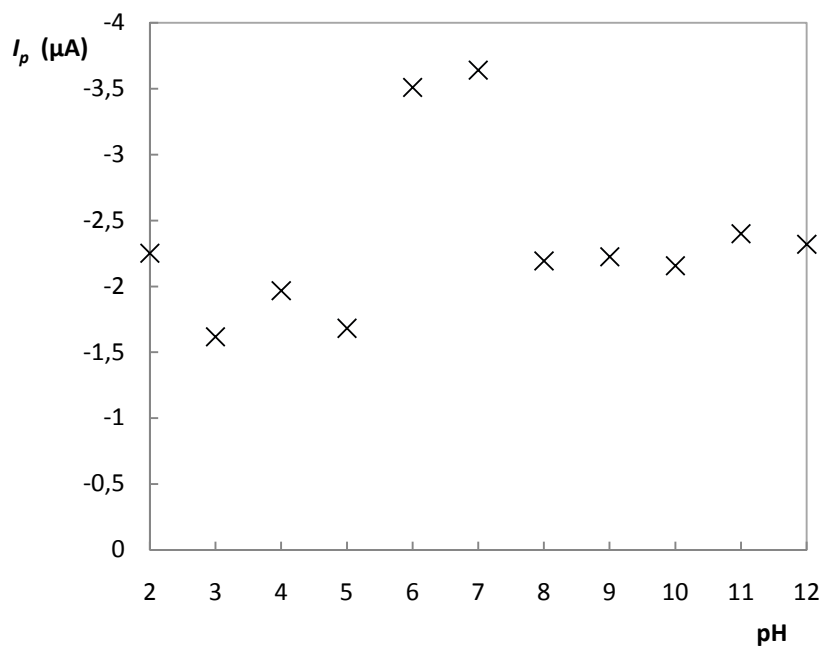
DP voltamogramy základního elektrolytu (BR pufr) o různých hodnotách pH, měřeno pomocí F-CPE. Hodnoty pH pufru jsou zobrazeny u křivek.

3.2 Optimalizace pH prostředí

Vliv pH prostředí na chování analytu se zkoumá proto, aby bylo možné zvolit optimální pH ke stanovení, tedy pH, při kterém je pík analytu nejlépe vyvinutý, v tomto případě je navíc důležité, aby kyslík neinterferoval s měřením metronidazolu.

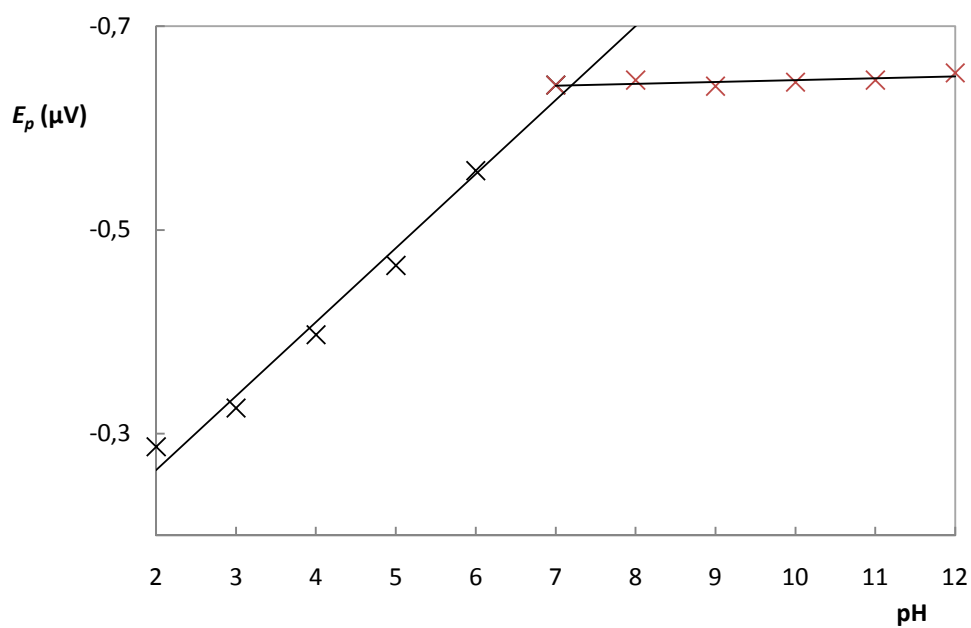
Vliv pH prostředí na chování metronidazolu byl sledován na nemodifikované CPE v prostředí BR pufru o hodnotě pH 2 až 12. Koncentrace používaného roztoku byla 1×10^{-4} mol/l. Naměřené hodnoty proudu (I_p) a potenciálu (E_p) na pH jsou zobrazeny na Obr. 6 a Obr. 7. Jak můžeme vidět z těchto dvou obrázků, nejvyšší hodnoty proudu byly naměřeny v prostředí neutrálních pH, což je pravděpodobně zapříčiněno vlivem slítí píku analytu se signálem kyslíku, který odezvu neúměrně zvětšil. Elektrický potenciál píku se se zvyšujícím pH posouvá z hodnoty cca -300 mV k hodnotě cca -650 mV, přičemž s dalším zvyšováním pH se již neposouvá k zápornějším hodnotám potenciálu. Naměřené voltamogramy jsou k vidění na Obr. 8.

K dalším měřením pomocí CPE bylo zvoleno pH 10, při kterém jsou interference kyslíku nejmenší. V případě modifikovaných elektrod (tedy S-CPE a F-CPE) bylo pH stanovení limitováno oblastí, kde probíhá uspokojivě potlačení vlivu kyslíku, tedy pro S-CPE pH 7 a pro F-CPE pH 4. Budeme-li předpokládat podobně konstantní závislost výšky píku na pH jako u nemodifikované CPE, bude mít toto omezení na stanovení jen malý vliv.



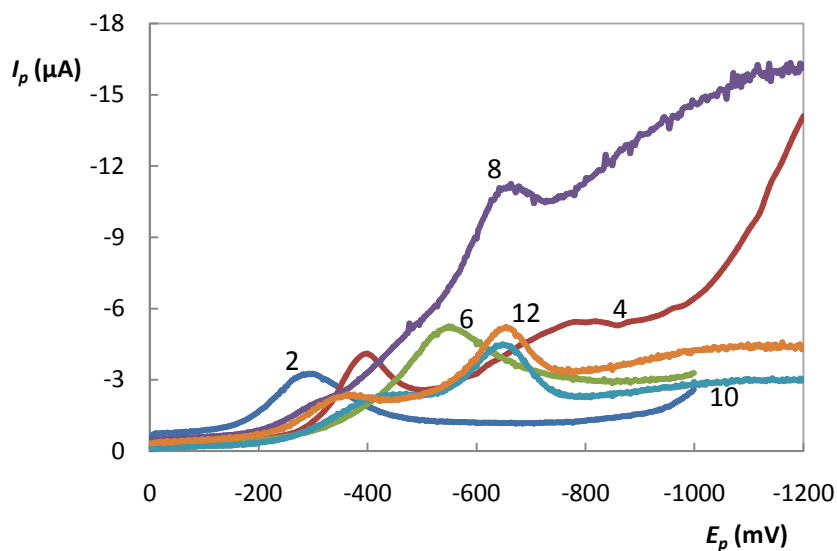
Obr. 6

Závislost proudu píku roztoku metronidazolu o koncentraci 1×10^{-4} mol/l na pH prostředí, měřeno metodou DPV pomocí CPE.



Obr. 7

Závislost potenciálu píku metronidazolu o koncentraci 1×10^{-4} mol/l na pH prostředí, měřeno metodou DPV pomocí CPE v prostředí BR pufru.

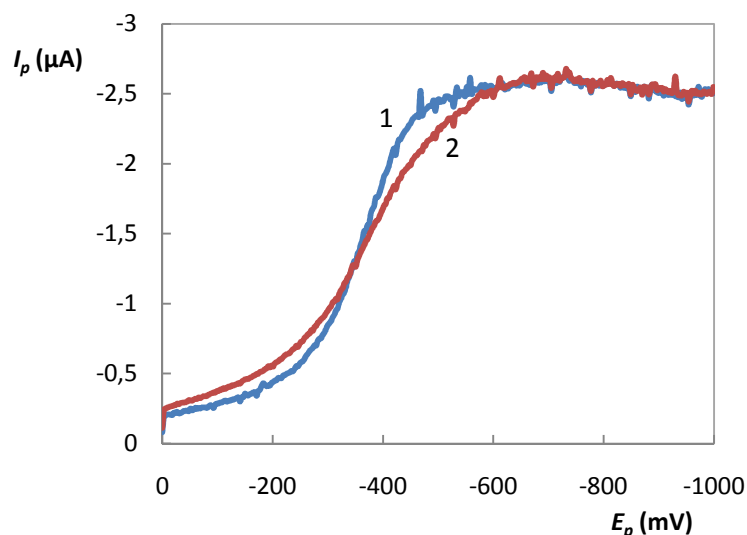


Obr. 8

DP voltamogramy metronidazolu o koncentraci 1×10^{-4} mol/l v prostředí BR pufru. Měřeno pomocí CPE. Hodnoty pH pufru jsou uvedeny u křivek.

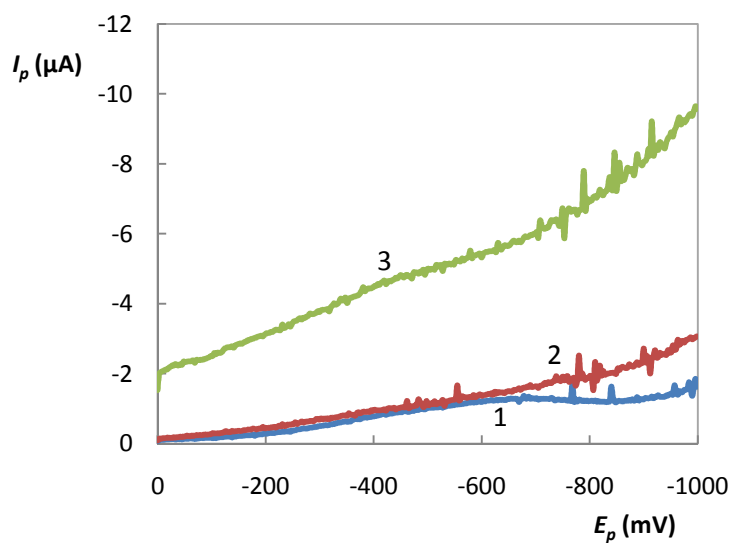
3.2 Optimalizace množství modifikátoru

Jedním z dalších měření bylo zkoumání vlivu obsahu modifikátoru v pastě na chování kyslíku. Byla provedena měření s pastami o obsahu 7 % a 10 % modifikátoru, pro F-CPE navíc ještě 3% zastoupení fosforanu sodného v pastě, vše měřeno při zvoleném pH pro danou elektrodu. Naměřené voltamogramy jsou k vidění na Obr. 9 a Obr. 10.



Obr. 9

DP voltamogramy základního elektrolytu, naměřené pomocí S-CPE s podílem siřičitanu sodného v pastě 7 % (1) a 10 % (2) hmotnosti grafitu, v prostředí BR pufru o pH 7.



Obr. 10

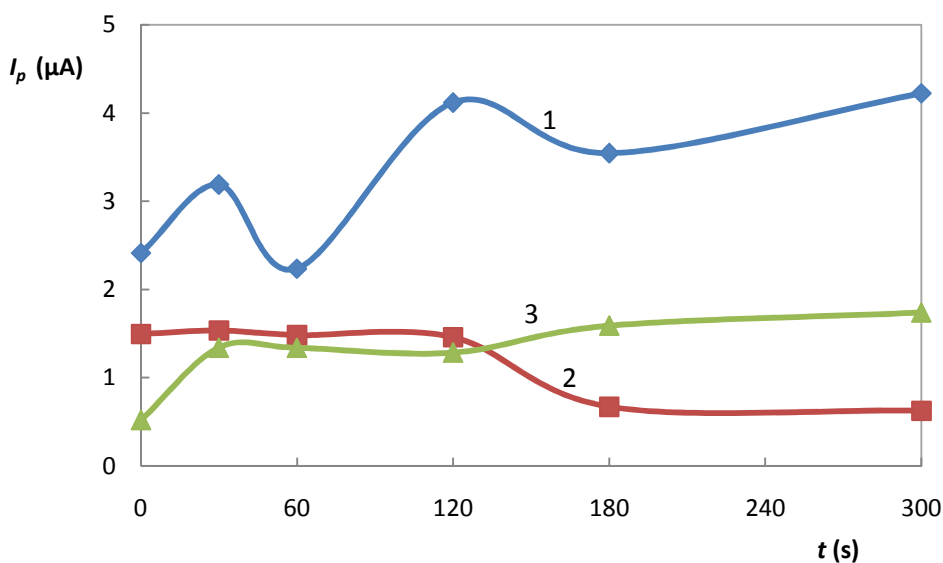
DP voltamogramy základního elektrolytu, naměřené pomocí F-CPE s podílem fosforanu sodného v pastě 3 % (1), 7 % (2) a 10 % (3) hmotnosti grafitu, v prostředí BR pufru o pH 4.

Z Obr. 9 a Obr. 10 je patrné, že u S-CPE je vliv množství modifikátoru malý, proto bylo zvoleno 10% zastoupení siřičitanu sodného v pastě. Naopak u F-CPE došlo při snížení

obsahu modifikátoru ke snížení proudu pozadí; na druhou stranu u 3% zastoupení fosforanu sodného už pasta neplnila svou funkci, objevila se vlna kyslíku. Pro další měření bylo proto zvoleno 7% zastoupení fosforanu sodného v pastě.

3.3 Ověření možnosti akumulace

Akumulace látky na elektrodě se využívá ke zvýšení citlivosti stanovení. Měření byla prováděna v míchaném roztoku metronidazolu o koncentraci 1×10^{-4} mol/l v optimálních pH pro danou elektrodu, vždy v časech 30, 60, 120, 180 a 300 sekund. Graf znázorňující závislost výšky píku (tedy schopnost akumulace) na době, po kterou byla elektroda ponechána v roztoku, je k vidění na Obr. 11. Ani u jedné z elektrod se akumulací krok dostatečně neprojevil, proto bylo rozhodnuto tento krok u dalších měření vynechat, případně v budoucnu opakovat s nižšími koncentracemi analytu.



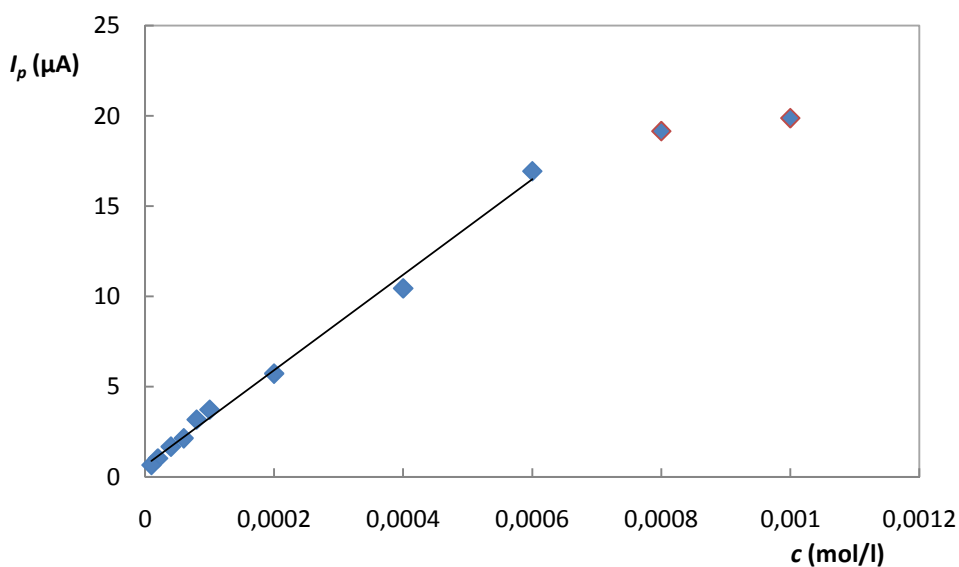
Obr. 11

Závislost proudu píku metronidazolu o koncentraci 1×10^{-4} mol/l na době akumulace, měřeno metodou DPV v prostředí BR pufru, pro CPE (1) pH 10, pro S-CPE (2) pH 7 a pro F-CPE (3) pH 4.

3.4 Koncentrační závislost

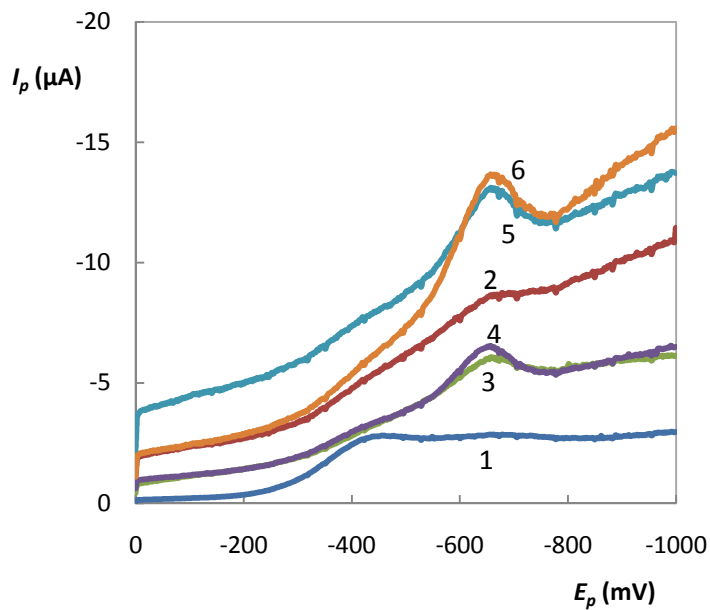
3.4.1 Kalibrační závislost měřená pomocí CPE

Měření byla prováděna pro koncentrace v rozmezí 1×10^{-5} až 1×10^{-3} mol/l v prostředí BR pufru o pH 10 pomocí CPE. Před měřením byl roztok vždy 5 minut probubláván dusíkem k odstranění kyslíku z roztoku. Závislost proudu píku na koncentraci metronidazolu je zobrazena na Obr. 12, změřené voltamogramy pak na Obr. 13 a Obr. 14. Přehled parametrů kalibračních přímků všech kalibračních závislostí je zobrazen v Tab. II (kapitola 3.4.4).



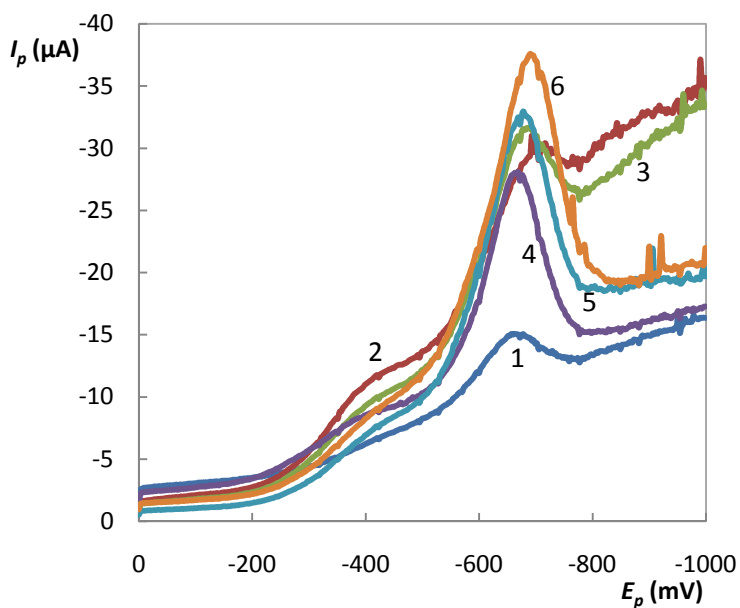
Obr. 12

Graf závislosti proudu píku na koncentraci metronidazolu, měřeno metodou DPV pomocí CPE v prostředí BR pufru o pH 10.



Obr. 13

DP voltamogramy roztoku metronidazolu o koncentraci 1×10^{-5} (2), 2×10^{-5} (3), 4×10^{-5} (4), 6×10^{-5} (5), 8×10^{-5} (6) mol/l spolu s křivkou základního elektrolytu (1), měřeno v BR pufru o pH 10 pomocí CPE.

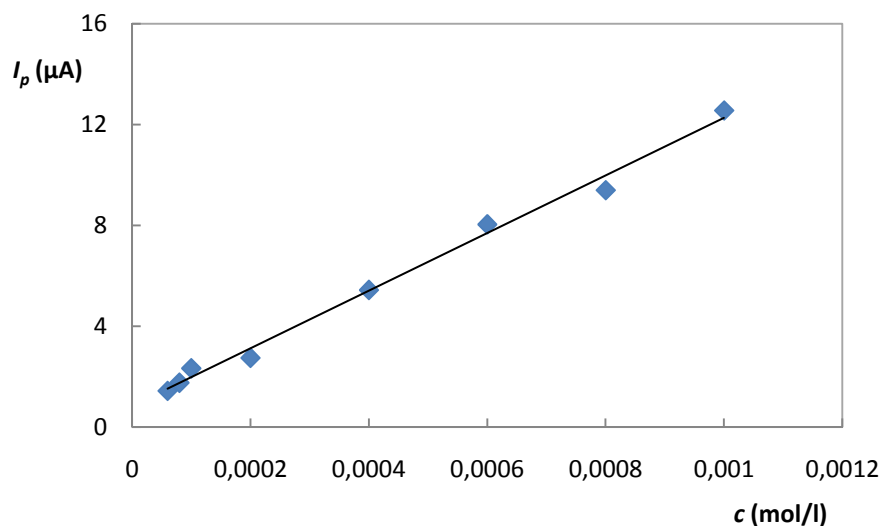


Obr. 14

DP voltamogramy roztoku metronidazolu o koncentraci 1×10^{-4} (1), 2×10^{-4} (2), 4×10^{-4} (3), 6×10^{-4} (4), 8×10^{-4} (5), 1×10^{-3} (6) mol/l, měřeno v BR pufru o pH 10 pomocí CPE.

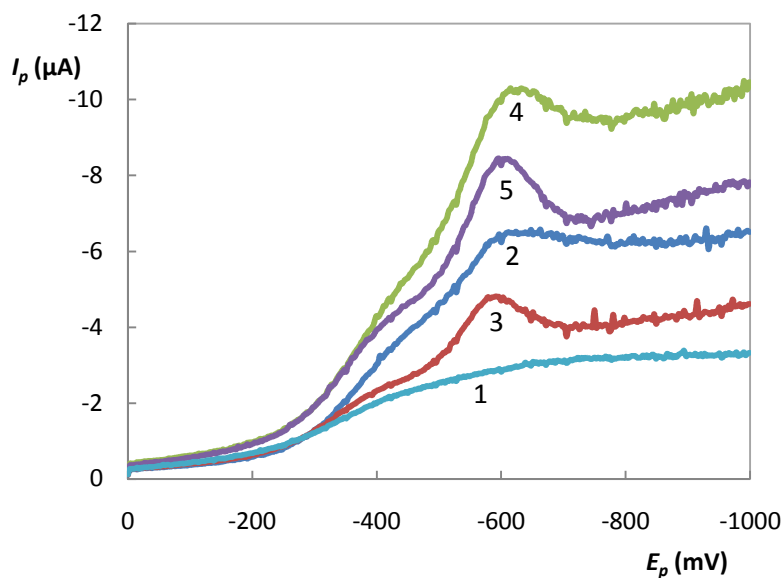
3.4.2 Kalibrační závislost měřená pomocí S-CPE

Měření byla prováděna pro koncentrace metronidazolu v rozmezí 6×10^{-5} až 1×10^{-3} mol/l v prostředí BR pufru o pH 7 pomocí S-CPE. Před měřením byl roztok vždy 5 minut probubláván dusíkem k odstranění kyslíku z roztoku. Závislost proudu píku na koncentraci metronidazolu je zobrazena na Obr. 15, změřené voltamogramy pak na Obr. 16 a Obr. 17. Přehled parametrů kalibrační přímky je k vidění v Tab. II (kapitola 3.4.4).



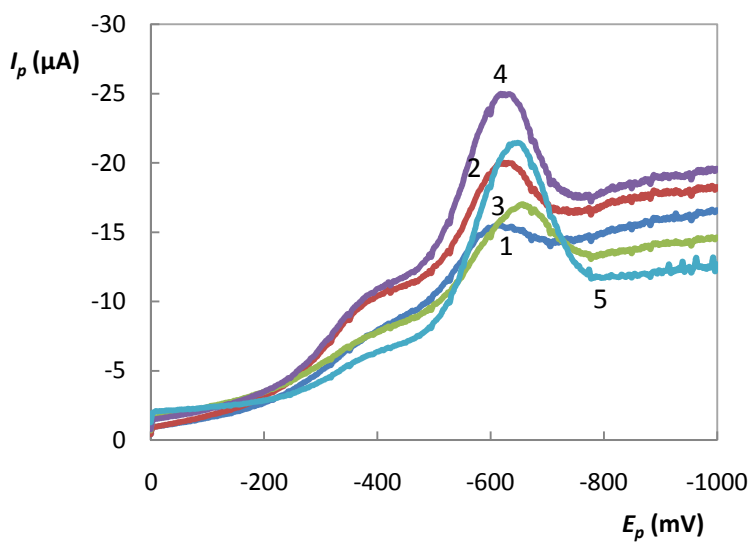
Obr. 15

Závislosti proudu píku na koncentraci metronidazolu, měřeno metodou DPV pomocí S-CPE v prostředí BR pufru o pH 7.



Obr. 16

DP voltamogramy roztoku metronidazolu o koncentraci 4×10^{-5} (2), 6×10^{-5} (3), 8×10^{-5} (4), 1×10^{-4} (5) mol/l s křivkou základního elektrolytu (1), měřeno v prostředí BR pufru o pH 7 pomocí S-CPE.

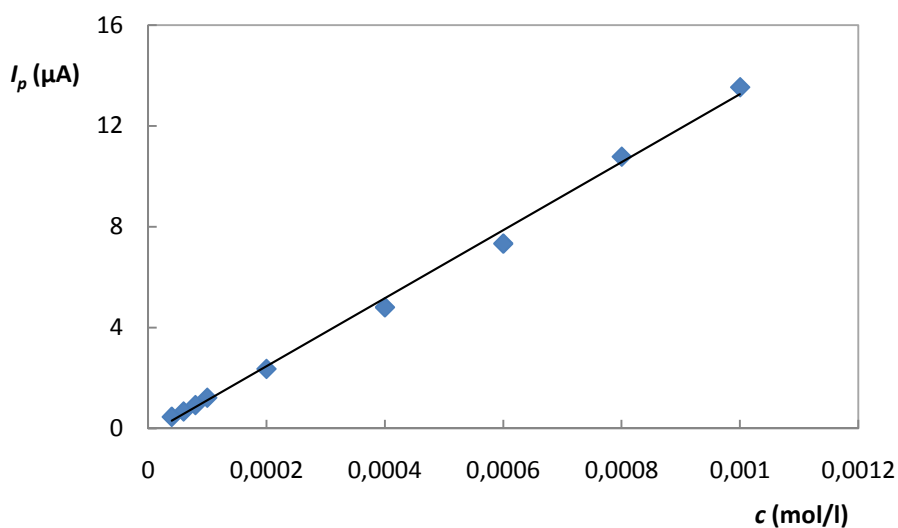


Obr. 17

DP voltamogramy roztoku metronidazolu o koncentraci 2×10^{-4} (1), 4×10^{-4} (2), 6×10^{-4} (3), 8×10^{-4} (4) a 1×10^{-3} (5) mol/l, měřeno metodou DPV pomocí S-CPE v prostředí BR pufru o pH 7.

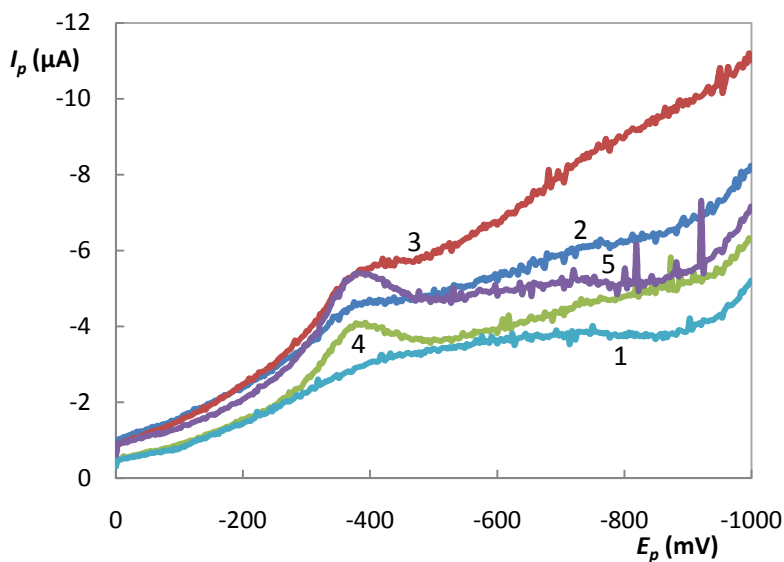
3.4.3 Kalibrační závislost měřená pomocí F-CPE

Měření byla prováděna pro koncentrace metronidazolu v rozmezí 4×10^{-5} až 1×10^{-3} mol/l v prostředí BR pufru o pH 4 pomocí F-CPE. Před měřením byl roztok vždy 5 minut probubláván dusíkem k odstranění kyslíku z roztoku. Závislost proudu píku na koncentraci metronidazolu je zobrazena na Obr. 18, změřené voltamogramy pak na Obr. 19 a Obr. 20. Parametry kalibrační přímky jsou zobrazeny v Tab. II (kapitola 3.4.4).



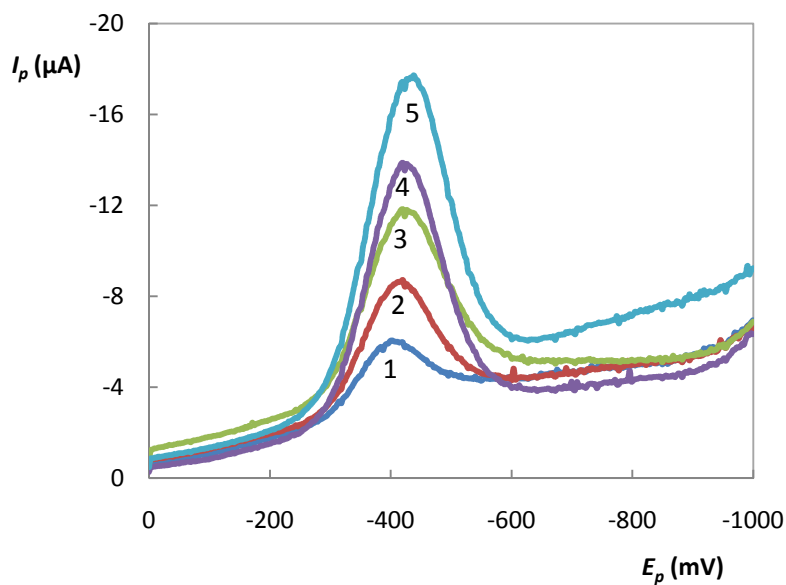
Obr. 18

Kalibrační závislost proudu píku na koncentraci metronidazolu, měřeno metodou DPV pomocí F-CPE v prostředí BR pufru o pH 4.



Obr. 19

DP voltamogramy roztoku metronidazolu o koncentraci 4×10^{-5} (2), 6×10^{-5} (3), 8×10^{-5} (4) a 1×10^{-4} (5) mol/l spolu s křivkou základního elektrolytu (1) v prostředí BR pufru o pH 4, měřeno pomocí F-CPE.



Obr. 20

DP voltamogramy roztoku metronidazolu o koncentraci 2×10^{-4} (1), 4×10^{-4} (2), 6×10^{-4} (3), 8×10^{-4} (4) a 1×10^{-3} (5) mol/l, měřeno v prostředí BR pufru o pH 4 pomocí F-CPE.

3.4.4 Porovnání kalibračních závislostí

Kalibrační závislosti u S-CPE i F-CPE jsou lineární v celém měřeném rozsahu (Tab. II), zatímco u CPE je zřejmě oblast nejvyšších koncentrací proložena mimo lineární rozsah.

Signál kyslíku je u CPE velmi proměnlivý, u S-CPE je signál kyslíku také pozorovatelný, což mohlo být způsobeno nerovnoměrným rozložením siřičitanu sodného v pastě, tedy nedokonalou homogenizací.

Pohledem do Tab. II můžeme říci, že LOD pro CPE a F-CPE jsou srovnatelné, nejvyšší LOD bylo dosaženo použitím S-CPE, protože při nižších koncentracích metronidazolu byla odezva špatně odečitatelná, pravděpodobně z důvodu slití odezvy s vlnou kyslíku a také vzhledem k velikosti šumu.

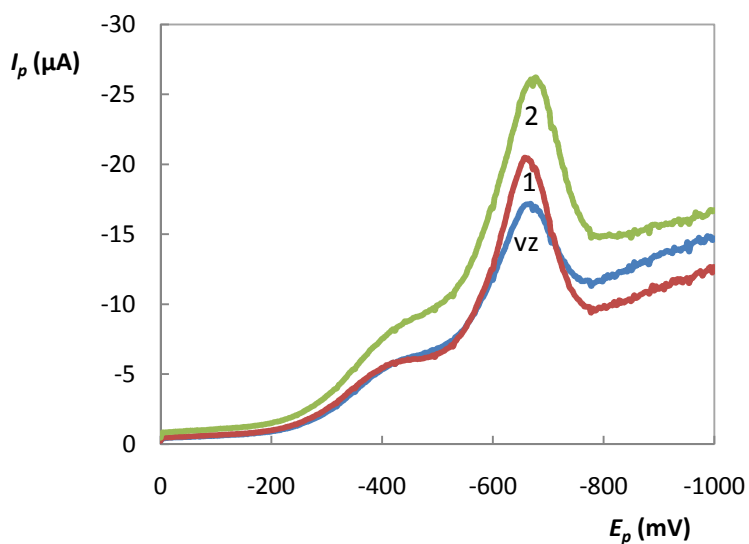
Tab. II: Přehled parametrů kalibračních přímk

Typ elektrody	Koncentrační rozmezí (mol/l)	Směrnice (mAxl/mol)	Úsek (nA)	<i>R</i>	LOD (mmol/l)	LOQ (mmol/l)
CPE	1×10^{-5} - 6×10^{-4}	26,4	607,0	0,9972	0,017	0,055
S-CPE	6×10^{-5} - 1×10^{-3}	11,4	830,1	0,9966	0,068	0,226
F-CPE	4×10^{-5} - 1×10^{-3}	13,5	-246,4	0,9984	0,013	0,042

3.5 Stanovení metronidazolu ve vzorku tablety

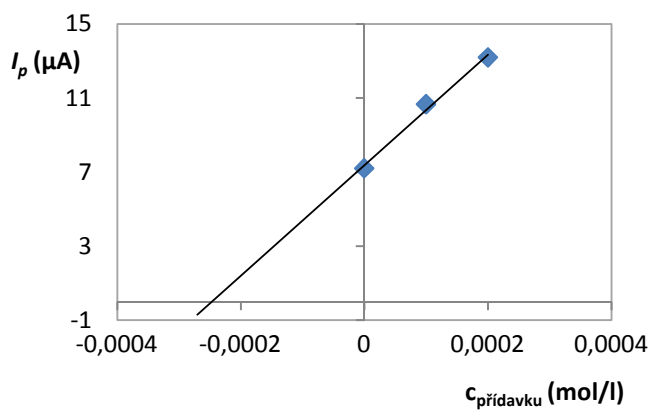
3.5.1 Stanovení metronidazolu ve vzorku tablety pomocí DPV

Vyvinuté metody byly testovány na farmaceutickém vzorku tablety Entizol s obsahem 250 mg metronidazolu. Roztok k měření byl připraven podle popisu v kapitole 2.5.2. Vzorek byl proměřen pomocí všech tří elektrod bez akumulčního kroku pomocí metody standardního přídávku. Byly použity dva přídávky standardu o koncentraci 5×10^{-3} mol/l, každý o objemu 200 μ l. Metoda standardního přídávku pak byla graficky vyhodnocena (Obr. 22). Voltamogramy jsou zobrazeny na Obr. 21, Obr. 23 a Obr. 25.



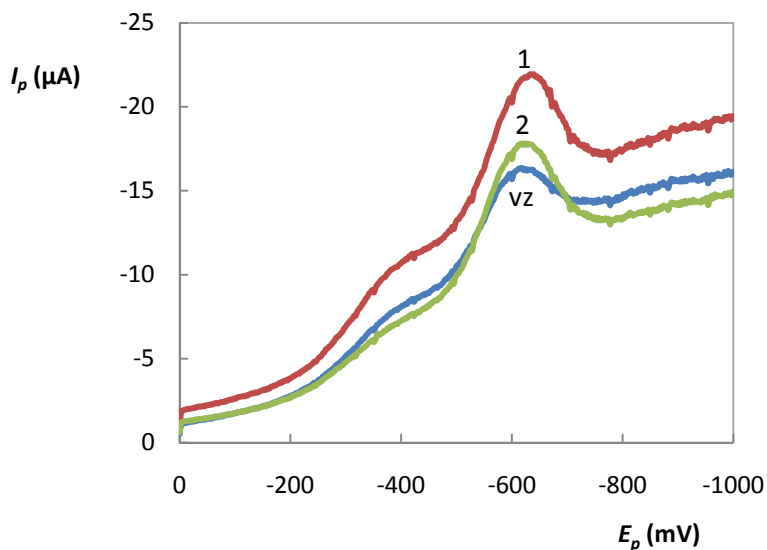
Obr. 21

DP voltamogramy zobrazující vzorek tablety (vz), 1. přídavek (1) a 2. přídavek (2), měřeno pomocí CPE v prostředí BR pufru o pH 10.



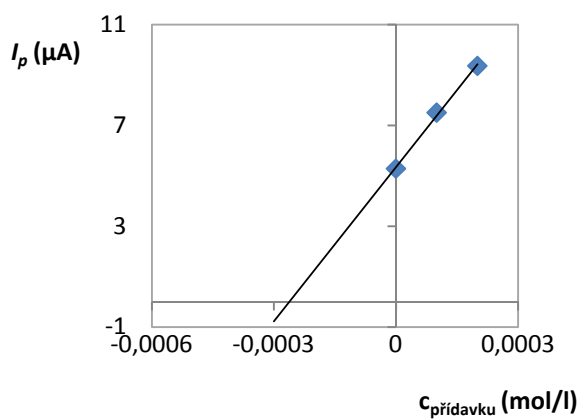
Obr. 22

Závislost proudu píku metronidazolu na koncentraci standardního přídavku o koncentraci 1×10^{-4} mol/l v prostředí BR pufru o pH 10, měřeno metodou DPV pomocí CPE.



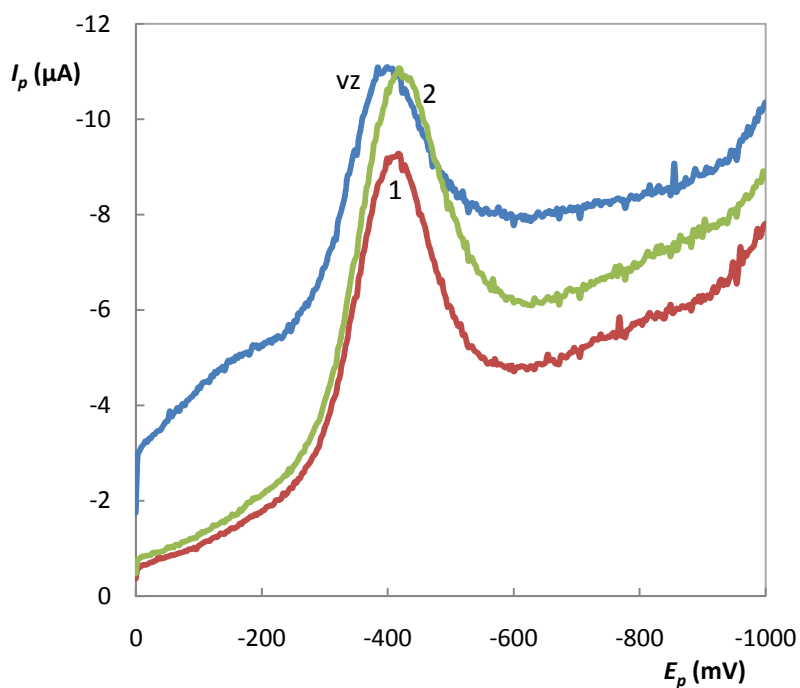
Obr. 23

DP voltamogramy vzorku tablety (vz), 1. přidavku (1) a 2. přidavku (2), měřeno pomocí S-CPE v prostředí BR pufru o pH 7.



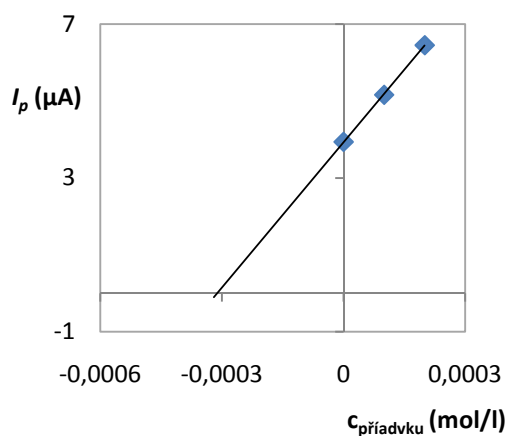
Obr. 24

Závislost proudu píku metronidazolu na koncentraci standardního přidavku o koncentraci 1×10^{-4} mol/l v prostředí BR pufru o pH 7, měřeno metodou DPV pomocí S-CPE.



Obr. 25

DP voltamogramy vzorku tablety (vz), 1. přídavku (1) a 2. přídavku (2), měřeno pomocí F-CPE v prostředí BR pufru o pH 4.

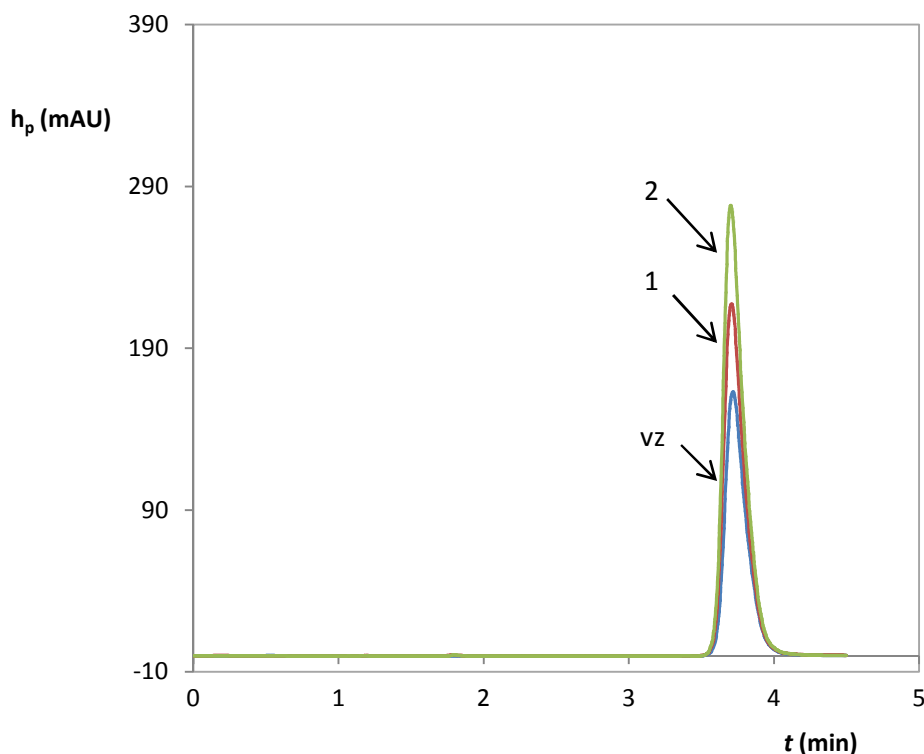


Obr. 26

Závislost proudu píku metronidazolu na koncentraci standardního přídavku o koncentraci 1×10^{-4} mol/l v prostředí BR pufru o pH 4, měřeno metodou DPV pomocí F-CPE.

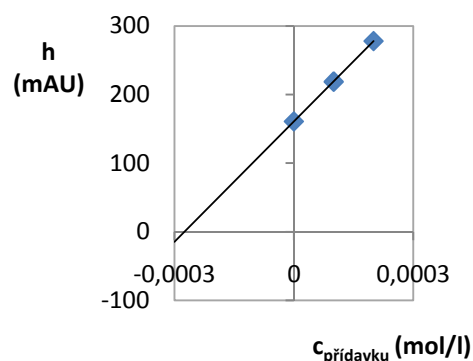
3.5.2 Stanovení metronidazolu ve vzorku tablety pomocí HPLC

Ke stanovení metronidazolu ve farmaceutickém vzorku byla jako srovnávací metoda použita HPLC s UV detektorem, stanovení probíhalo na koloně Kromasil C18 (250 mm x 4,6 mm) s částicemi o průměru 5 μm , jako mobilní fáze byla použita směs methanol:voda (40:60, V/V) a průtok byl nastaven na 1 ml/min, podmínky byly převzaty z článku [7]. Vlnová délka, při které byl detekován metronidazol, byla nastavena podle spektra v kapitole 2.6 na 320 nm. Reálné vzorky byly připraveny podle popisu v kapitole 2.5.2. Naměřené chromatogramy jsou k vidění na Obr. 27.



Obr. 27

Chromatogramy vzorku tablety (vz), 1. přídatku (1) a 2. přídatku (2) znázorňující vzrůst píku metronidazolu s přidáním množstvím standardu metronidazolu (vždy přídatek o koncentraci 1×10^{-4} mol/l). Měřeno pomocí RP-HPLC na koloně Kromasil C18 s UV detekcí při $\lambda=320$ nm, průtok mobilní fáze o složení methanol:voda (40:60, V/V) byl nastaven na 1 ml/min; bylo dávkováno 20 μl .



Obr. 28

Závislost výšky píku metronidazolu na koncentraci standardního přídatku o koncentraci 1×10^{-4} mol/l, měřeno metodou RP-HPLC.

3.5.3 Porovnání výsledků měření vzorků tablet

Statistická vyhodnocení pro sérii měření roztoku metronidazolu pomocí CPE, S-CPE, F-CPE a RP-HPLC jsou uvedena v Tab. III společně s parametry regresních rovnic. Deklarovaný obsah metronidazolu v tabletě je 250 mg.

Tab. III: Přehled parametrů regresních rovnic pro měření reálného vzorku různými metodami.

Metoda stanovení	Směrnice (mAxl/mol)	Úsek (μA)	R	x (mg)
CPE	28,7	7,11	0,9940	222,6
S-CPE	17,6	4,93	0,9928	241,3
F-CPE	10,8	3,25	0,9991	249,1
RP-HPLC	0,6	0,16	1	241,3

Z Tab. III je patrné, že největší shodu s deklarovanou hodnotou vykazuje voltametrické měření pomocí F-CPE, hodnoty získané chromatograficky a pomocí S-CPE se vzájemně shodují a jsou rovněž blízké deklarované hodnotě a jediné měření, jehož výsledky se významně liší od ostatních, je měření pomocí CPE.

Tab. IV: Přehled výsledků stanovení metronidazolu ve vzorcích tablet metodami DPV na CPE, S-CPE a F-CPE a RP-HPLC.

Metoda stanovení	$\bar{x} \pm s$ (mg)	\bar{x}/x_{HPLC} (%)	$\bar{x}/x_{\text{deklarovaná}}$ (%)
CPE	222,6 ± 12,8	92,3	89,0
S-CPE	241,3 ± 43,5	100,0	96,5
F-CPE	249,1 ± 47,2	103,2	99,6
RP-HPLC	241,3 ± 25,0	-	96,5

4. Závěr

Bylo studováno voltametrické chování metronidazolu na uhlíkové pastové elektrodě a dvou modifikovaných uhlíkových pastových elektrodách. Byla testována pH závislost a možnost akumulovat látku na elektrodě, byly proměřeny kalibrační křivky za optimálních podmínek pro každou elektrodu ke zjištění mezí detekce a stanovitelnosti. Navržená metoda stanovení pak byla ověřena na reálném vzorku tablet Entizol.

Proměřením pH závislosti bylo zjištěno, že optimální pH ke stanovení metronidazolu pomocí CPE je pH 10, ke stanovení pomocí S-CPE pH 7 a ke stanovení pomocí F-CPE pH 4. Při těchto hodnotách pH docházelo k nejmenším interferencím při měření.

Zvýšení citlivosti stanovení přidáním akumulacího kroku nebylo dosaženo ani po pěti minutách.

Byly proměřeny kalibrační křivky pro všechny elektrody. U CPE bylo měřeno v rozsahu koncentrací metronidazolu 1×10^{-5} až 1×10^{-3} mol/l, bylo dosaženo meze detekce $1,7 \times 10^{-5}$ a stanovitelnosti $5,6 \times 10^{-5}$ mol/l. S použitím S-CPE bylo měřeno v rozsahu koncentrací 6×10^{-5} až 1×10^{-3} mol/l, bylo dosaženo meze detekce $6,8 \times 10^{-5}$ a stanovitelnosti $2,3 \times 10^{-4}$ mol/l. S použitím F-CPE bylo měřeno v rozmezí koncentrací 4×10^{-5} až 1×10^{-3} mol/l, bylo dosaženo meze detekce $1,3 \times 10^{-5}$ a stanovitelnosti $4,3 \times 10^{-5}$ mol/l.

Obsah analytu v reálném vzorku tablet Entizol byl stanovován voltametricky všemi třemi elektrodami a následně metodou RP-HPLC. Největší shody s deklarovaným obsahem metronidazolu ve vzorku tablety bylo dosaženo použitím F-CPE, naopak nejmenší shodu vykazovalo měření pomocí CPE.

5. Použitá literatura

- [1] Sydney M., Finegold M.D.: Metronidazole. *Annals of Internal Medicine* 93, 585-586 (1980).
- [2] Stover K. R., Riche D. M., Gandy Ch. L., Henderson H.: What would we do without metronidazole? *American Journal of the Medical Sciences* 343, 316-319 (2012).
- [3] Hainer B. L., Gibson M. V.: Vaginitis: Diagnosis and treatment. *American Family Physician* 83, 807-815 (2011).
- [4] Report of carcinogens, Twelfth edition. *Fourth Annual Report on Carcinogens*, 269-270 (1985).
- [5] Health Encyclopedia – Diseases and Conditions: Metronidazole – Symptoms, Treatment and Prevention. URL: <http://www.healthscout.com/ency/1/214/main.html>
- [6] Akay C., Özkan S.A., Sentürk Z., Cevheroglu S.: Simultaneous determination of metronidazole and miconazole in pharmaceutical dosage forms by RP-HPLC. *Il Farmaco* 57, 953-957 (2003).
- [7] Tölgyesi A., Sharma V.K., Fekete S., Fekete J., Simon A., Farkas S.: Development of a rapid method for the determination and confirmation of nitroimidazoles in six matrices by fast liquid chromatography–tandem mass spektrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 64-65, 40-48 (2012).
- [8] Salem A.A., Mossa H.A., Barsoum B.N.: Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy for quantitative analysis of miconazole, metronidazole and sulfamethoxazole in pharmaceutical and urine samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 654-661 (2006).
- [9] Özkan S.A., Özkan Y., Sentürk Z.: Electrochemical reduction of metronidazole at activated glassy carbon electrode and its determination in pharmaceutical dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 17, 299-305 (1998).
- [10] Peng J., Hou Ch., Hu X.: Determination of metronidazole in pharmaceutical dosage forms based on reduction at graphene and ionic liquid composite film modified electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* 169, 81-87 (2012).
- [11] Adams R.N.: Carbon paste electrodes. *Analytical Chemistry* 30, 1576-1578 (1958).
- [12] Vytřas K., Švancara I., Metelka R.: Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry. *Journal of Serbian Chemical Society* 74, 1021-1033 (2009).
- [13] Švancara I., Vytřas K., Barek J., Zima J.: Carbon paste electrode in modern electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 31, 311-345 (2001).

- [14] Švancara I., Schachl K.: Testing of unmodified carbon paste electrodes. *Chemické listy* 93, 490-499 (1999).
- [15] Švancara I., Vytřas K.: Preparation and properties of carbon paste electrodes. *Chemické listy* 88, 138-146 (1994).
- [16] Kuwana T., French WG.: Electrooxidation or reduction of organic compounds into aqueous solutions using carbon paste electrode. *Analytical Chemistry* 36, 241-242 (1964).
- [17] Kalcher K.: Chemically modified carbon paste electrodes in voltammetric analysis. *Electroanalysis* 2, 419-433 (1990).
- [18] Lindquist J.: Carbon paste electrode with a wide anodic potential range. *Analytical Chemistry* 45, 1006-1008 (1973).
- [19] Švancara I., Vytřas K.: Voltammetry with carbon paste electrodes containing membrane plasticizers used for PVC-based ion-selective electrodes. *Analytica Chimica Acta* 273, 195-204 (1993).