

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE
obor: Klinická a toxikologická analýza

**STANOVENÍ CHLORAMFENIKOLU NA
UHLÍKOVÝCH PASTOVÝCH ELEKTRODÁCH**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

PRAHA 2006

HELENA PUDILOVÁ

Klíčová slova: chloramfenikol

DC voltametrie

diferenční pulsní voltametrie

uhlíková pastová elektroda

Úvodem bych chtěla poděkovat svému školiteli Doc. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc. za odborné vedení a dále také všem členům Katedry analytické chemie za všestrannou pomoc a cenné připomínky k mé práci.

Zároveň bych ráda poděkovala svým rodičům za umožnění studia na vysoké škole a celé rodině i přátelům za podporu.

Obsah

1 Teoretická část

1. 1. Úvod.....	9
1.2. Přehled problematiky	10
1.2.1. Využití chloramfenikolu	10
1.2.2. Mechanismus působení	11
1.2.3. Vedlejší účinky CAP	13
1.2.4. Farmakokinetika CAP	16
1.2.5. Charakteristika studované látky	18
1.2.6. Metody stanovení.....	20
1.2.6.1. Regulace používání CAP	20
1.2.6.2. Metody používané ke stanovení CAP	21
1.2.7. Uhlíková pastová elektroda.....	23

2 Experimentální část

2.1. Chemikálie:	29
2.2. Aparatura:	30
2.2.1. Pracovní elektroda - CPE.....	31
2.3. Stálost zásobního roztoku.....	31
2.4. Pracovní postupy	33

3 Stanovení CAP DC voltametrií

3.1. Vliv pH.....	35
3.2. Koncentrační závislosti	38
3.3. DC adsorpční rozpouštěcí voltametrie	41

4 Stanovení CAP diferenční pulsní voltametrií

4.1. Vliv pH.....	42
4.2. Koncentrační závislosti	45
4.3. Diferenční adsorpční rozpouštěcí voltametrie	48

5 Závěr.....

6 Použitá literatura.....

Seznam použitých zkratek a symbolů

AdSV	adsorpční rozpouštěcí voltametrie
ATB	antibiotikum
ATP	adenosintrifosfát
BR pufr	Brittonův - Robinsonův pufr
<i>c</i>	látková koncentrace
C.A.S.	Chemical Abstract Services
CAP	chloramfenikol
CPE	uhlíková pastová elektroda
DCP	polarografie s lineárním nárůstem potenciálu
DCV	voltametrie s lineárním nárůstem potenciálu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPP	diferenční pulsní polarografie
DPV	diferenční pulsní voltametrie
ELISA	heterogenní enzymová imunoanalýza
E_p	potenciál píku
FAO	organizace pro výživu a zemědělství
GC	plynová chromatografie
GC-ECD	plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu
GC-MS-EI-SIM	plynová chromatografie s hmotnostním detektorem s elektronovou ionizací v režimu sledování vybraných iontů
GC-MS-NCI-SIM	plynová chromatografie s hmotnostním detektorem s chemickou ionizací (vznik negativních iontů) v režimu sledování vybraných iontů
HPDPP	vysokoúčinná diferenční pulsní polarografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
I_p	proud píku
<i>k</i>	směrnice lineární závislosti

LC	kapalinová chromatografie
L_Q	mez stanovitelnosti
M	$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
M_r	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
p.a.	pro analýzu
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
PVC	polyvinylchlorid
RIA	radioimunoanalýza
SWV	voltametrie se čtvercovými vlnami
t	čas
WHO	Světová zdravotnická organizace
λ_{max}	vlnová délka absorpčního maxima
ρ	hustota

1. Teoretická část

1. 1. Úvod

Chloramfenikol (CAP) patří do skupiny amfenikolových antibiotik. Je to širokospektré antibiotikum produkované aktinomycetami. Působí primárně bakteriostaticky zásahem do syntézy bílkovin a nukleových kyselin. Antibiotika mohou mít spoustu nežádoucích účinků, jako je nevolnost, vyrážky a alergie. Kromě jiného je zde riziko vzniku rezistence na antibiotikum. U chloramfenikolu se navíc vyskytuje orgánová toxicita (myelotoxicita) kostní dřeně. I když není výskyt takovéto reakce častý, je v mnohých případech smrtelný. Z těchto důvodů je třeba zamezit nevhodné expozici člověka chloramfenikolu, neboť není jasné, jaká je nejvyšší přípustná koncentrace. Proto Světová zdravotnická organizace (WHO) rozhodla, že není přípustná jiná než nulová hladina CAP reziduí, což je samozřejmě omezeno analytickými metodami a jejich mezemi detekce či stanovitelnosti [1]. Proto se stále hledají nové metody, kterými by se dalo dosáhnout stále nižších mezí stanovitelnosti.

Cílem této práce bylo nalezení vhodných podmínek pro stanovení chloramfenikolu na uhlíkových pastových elektrodách a zjistit, jakých nejnižších mezí stanovitelnosti lze dosáhnout zvolenými voltametrickými metodami.

Uhlíkové pastové elektrody (CPE) mají mnohé přednosti. Je to například nízká hodnota zbytkových proudů, která umožňuje dosažení nízkých mezí stanovitelnosti, a to především v oblasti anodických potenciálů. Touto vlastností předčí grafitové materiály, elektrody ze zlata i platiny. Další výhody jsou volitelnost složení pasty a snadná regenerace povrchu elektrod. Ve srovnání s kovovými elektrodami jsou méně náchylné k oxidaci povrchu, a tím jeho pasivaci [2]. Využití CPE v oblasti záporných potenciálů však není

příliš výhodné, neboť se při provádění katodických redukcí na CPE může často nepříznivě uplatňovat kyslík rozpuštěný v pastě.

1.2. Přehled problematiky

1.2.1. Využití chloramfenikolu

Chloramfenikol byl původně izolován z kultury *Streptomyces venezuelae* v r. 1947. Toto širokospektré antibiotikum působí na gram-pozitivní a gram-negativní mikroorganismy, aerobní i anaerobní bakterie, *rickettsie*, *chlamydie*, *spirochety* a *mycoplasma* [3], nepůsobí na *Mycobacterium tuberculosis* a viry.

Chloramfenikol byl široce používán od 50. let. Nyní se vyhrazuje jen v případech život ohrožujících onemocnění, například pro střevní infekce jako břišní tyf, záněty mozkových plen - bakteriální meningita, sepse a tzv. anaerobní infekce. Zvláště dobře působí na *Haemophilus influenzae* (způsobující meningitidu), i když v tomto případě již existují cefalosporiny třetí generace (cefotaxim, ceftriaxon, ceftizoxim), které mohou nahradit CAP alespoň v počátku terapie při podezření na infekci tímto mikroorganismem. Chloramfenikol také působí na *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhi* a druhy *Neisseria*. Dále chloramfenikol působí a může se použít na patogenní bakterie druhu *Bordetella pertussis* způsobující černý (dávivý) kašel, na *Rickettsia prowazekii* (skvrnitý tyf), *Shigella dysenteriae* (bakteriální úplavice).

CAP je antibiotikum předepisované dnes v širokém rozsahu hlavně ve formě očních kapek nebo mastí k léčbě konjunktivitid (zánětu spojivek). Aplikace ve formě tablet nebo injekcí s sebou nese riziko aplastické anémie (neschopnost kostní dřeně produkovat krvinky). Působí tlumivě na krvetvorbu a snižuje tvorbu protilátek. Novorozencům a nedonošeným dětem se nesmí podávat v žádném případě [4].

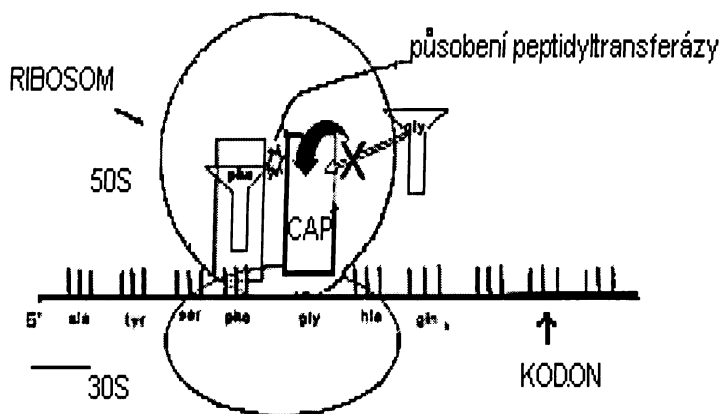
Chloramfenikol se stále hojně používá ve veterinární medicíně [5] u nemocí způsobených organismy jako je *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Brucella bronchoseptica*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Aerobacter aerogenes*, *Corynebacterium renale*, *Salmonella species*, *Pseudomonas species*, *Shigella species*, *Neisseria catarrhalis*, anaerobní bakterie a *rickettsiae*. Druhy zvířat, kterým se běžně CAP podává, jsou psi, kočky a koně. Používá se také u skotu, prasat a drůbeže [6]. Aplikace CAP na zvířata nevyvolává u nich nežádoucí účinky jako u člověka. Používání CAP ve veterinární medicíně u hospodářských zvířat ale vede k výskytu reziduí tohoto antibiotika v potravinách.

Chloramfenikol se také dříve používal k prevenci mikrobiálních infekcí na ovoci a zelenině [1].

1.2.2. Mechanismus působení

Hlavním cílovým místem účinku přirozených i syntetických antibiotik jsou bakteriální ribosomy, které jsou obecně místem proteosyntézy. Ribosom je proteosyntetický komplex organizovaný do dvou podjednotek: malé a velké, označených Svedbergovou sedimentační konstantou S. Prokaryotické ribosomy mají sedimentační koeficient 70S. Eukaryotický ribosom je větší než prokaryotický, jeho hodnota kolísá kolem 80S v závislosti na fylogenetickém druhu. Mitochondrie mají své vlastní ribosomy, které jsou podobné ribosomům prokaryot strukturou i citlivostí vůči inhibičnímu účinku antibiotika při translaci.

Na ribosomu jsou dvě hlavní vazebná místa pro tRNA: A-místo pro aminoacyl-tRNA a P-místo pro peptidyl-tRNA, kde dochází k vytvoření peptidové vazby. Chloramfenikol se váže na velkou podjednotku ribosomu, jejíž integrální součástí je enzym peptidyltransferáza (katalyzuje tvorbu bílkovin a nukleových kyselin). CAP inhibuje činnost enzymu znesnadněním vazby tRNA na A-místo a brání vytvoření peptidové vazby v tvořícím se polypeptidovém řetězci, viz obr. 1.



Obr. 1 Působení chloramfenikolu na ribosomu

Terapeutický účinek antibiotik může být znehodnocen vznikem rezistence patogenních bakterií vůči některým antibiotikům. Tato rezistence má řadu mechanismů, jako je vypuzení léku z bakterie, jeho inaktivace nebo alterace cílového místa účinku. Řada bakteriálních kmenů se stává rezistentními změnou specifických nukleotidů v aktivním centru peptidyltransferázy. CAP má několik reaktivních skupin, které mohou vytvářet vodíkové můstky s různými nukleotidy v prohlubni peptidyltransferázy. Mutace nukleotidu v blízkosti této potenciální vazby navodí bakteriální rezistenci.

CAP zároveň působí inhibici mitochondriální proteinové syntézy v savčích buňkách, neboť mitochondriální ribosomy se podobají bakteriálním (oboje jsou 70S) více než 80S savčí cytoplazmatické ribosomy. Toto je pravděpodobně zodpovědné za anémii, jejíž vznik je závislý na podané dávce chloramfenikolu. Savčí hematopoetické buňky se zdají zvláště citlivé.

CAP ireverzibilně inhibuje jaterní mikrosomální cytochrom P450 a to může prodlužovat vylučování některých látek z organismu. Zdá se, že inhibicí mitochondriální proteinové syntézy také snižuje množství proteinů jako cytochrom c oxidáza, ubichinon-cytochrom c reduktáza a ATPsyntáza, které jsou součástí vnitřní mitochondriální membrány.

1.2.3. Vedlejší účinky CAP

Při podávání antibiotik se můžou vyskytnout různé nežádoucí účinky, při nichž je třeba ATB vysadit. Antibiotika mohou zničit přirozenou mikroflóru, a v organismu se pomnoží plísně, kvasinky a vzniká např. moučnivka, dysmikrobiální průjem, u žen vaginální mykózy.

Mezi vyskytující se nežádoucí účinky chloramfenikolu patří trávicí potíže, převážně se objevující po perorálním podání. Jsou to nauzea, zvracení a průjem.

Dále má účinky na centrální nervovou soustavu. U některých pacientů dostávajících CAP byly popsány bolesti hlavy, lehké deprese, zmatenost a delirium.

Vyrážky se vyskytují převážně po lokálním použití.

Mezi velmi vážné a někdy až smrtelné patří nežádoucí působení CAP na krev. Získaná hypersenzitivita po předchozí sensibilaci lékem se projevuje dvěma typy hematologických poruch.

První je na dávce závislá a reverzibilní anémie, mající tendenci se objevit pokud hladina CAP v séru přesáhne $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [3]. Dochází k narušení krvetvorby pravděpodobně potlačením mitochondriální proteosyntézy buněk v kostní dřeni, čímž je ovlivněno zrání erytrocytů. Po vysazení léku se vrací krevní obraz do normy.

Druhou velice vážnou poruchou, i když ne objevující se tak často, je aplastická anémie, která je obecně ireversibilní a často smrtelné onemocnění [7]. Tato nemoc se objevuje průměrně u jednoho z 25 000 až 40 000 pacientů léčených CAP a je nezávislá na podávané dávce či délce terapie. Projevy aplastické anémie se objevují týdny i měsíce po léčení chloramfenikolem [3]. Aplastická anémie se objevuje během systémové aplikace nebo i po lokální terapii chloramfenikolem, je doprovázená hypoplastickou anémií, což je nedokonalý vývin krevních buněk v kostní dřeni projevující se sníženým počtem červených krvinek v obvodové krvi. Při aplastické anémii je většinou postižena i složka bílé a destičkové krvetvorby tím, že kostní dřeň není schopna produkovat kmenové buňky pro jejich

tvorbu. Akutní forma anémie se projevuje krvácením do kůže, sliznic, dutiny ústní, gastrointestinálního traktu, dělohy. Chronický stav začíná anemickými příznaky, projevuje se to ochablostí, mdlobami, bušením srdce, krvácivostí a může dojít až na nekrózy. Je také snížena inkorporace železa do červených krvinek [8]. Pravděpodobnost úmrtí pacienta je veliká. V případech, kdy došlo k zotavení, se ukázalo, že po léčení CAP se objevuje leukémie indukovaná aplastickou anémií [9]. Z 641 případů krevních poruch způsobených chloramfenikolem bylo 464 případů aplastická anémie a v 27 případech propukla leukémie [10].

Mechanismus působení CAP na vznik anémie není znám. Vzácnost projevu aplastické anémie napovídá, že je to spíše projev závislý na neznámé genetické predispozici. A proto se tento efekt CAP neprojevil v klinických testech ve fázích 1, 2 a 3 ani při toxikologických testech na zvířatech, na které CAP nemá podobný vliv [11]. To by mohl dokazovat i průzkum z Hong Kongu, kde léčba CAP je poměrně častá i u lidí a přesto výskyt úmrtí spojený s aplastickou anémií je o polovinu nižší než například v Evropě či Austrálii [12]. Také to bylo pozorováno v rodinách a u identických dvojčat při expozici CAP. Není ale dostupná žádná studie, která by potvrzovala, že buňky kostní dřeně nebyly poškozeny i jiným mechanismem, či že jsou nějakým způsobem citlivější na expozici CAP. Předpokládá se, že za vznik anémie může být zodpovědný i metabolit nitrosochloramfenikol. Ten se může vytvořit redukcí CAP v lidských játrech *in vitro*. Tato látka je známá svou toxicitou na lidskou kostní dřeň *in vitro* a je mnohem více toxická než sám CAP. Jak CAP, tak nitrosochloramfenikol jsou distribuovány velmi rychle do buněk, ale nitrosoderivát se váže na buňky kostní dřeně 15krát pevněji než chloramfenikol. Nitrosochloramfenikol blokuje transport protonů z mitochondrií inhibicí ATPázy, indukuje zlomy na DNA [10]. Testy *in vitro* předpokládají, že nitrosoCAP může být významným metabolitem v lidském organismu, není však pro to žádný *in vivo* důkaz. *In vitro* se v lidské krvi nitrosoderivát váže na albumin, v červených krvinkách se váže na glutathion a tvoří vazby s SH skupinou hemoglobinu [6].

Několik studií ukazuje, že dehydrochloramfenikol, metabolický produkt střevních bakterií, může být také zodpovědný za poškození DNA a karcinogenitu. V kostní dřeni může dojít k redukci nitroskupiny na tomto metabolitu a způsobit zlomy na DNA.

Mitochondriální abnormality, které způsobuje CAP, jsou velice podobné těm, které byly pozorovány před vypuknutím leukémie, tedy za předpokladu, že mitochondriální DNA hraje roli při vzniku leukémie [9].

Další z vážných nežádoucích účinků chloramfenikolu, je kardiovaskulární porucha - syndrom šedého dítěte. Tato toxická reakce vzniká při nevhodně velkém dávkování antibiotika u novorozenců nebo u nedonošených dětí. U novorozenců do jednoho týdne až jednoho měsíce stáří není vyvinut mechanismus biotransformace látek přes kyselinu glukuronovou. Proto se CAP velmi pomalu degraduje a špatně se vylučuje nekonjugovaný v ledvinách. Příznakem syndromu šedého dítěte je zvracení, dítě nesaje mléko, nepravidelně dýchá, objevuje se břišní distenze, dítě modrá, a jeho stolice je řídká a zelená. Děti takto vážně nemocné do 24 hodin začnou být malátné, jejich pleť se zbarví do popelavě šeda a teplota jejich těla klesá pod průměrnou hodnotu. Tento syndrom je nakonec charakterizován kardiovaskulárním kolapsem, zjevně způsobeným akumulací aktivního nekonjugovaného CAP v séru [10]. K smrti dojde během několika dnů i hodin [6]. Je-li podávání CAP včas zastaveno, dítě se může plně uzdravit. Tento syndrom většinou souvisí s koncentracemi CAP v plazmě nad 75 - 100 $\mu\text{.ml}^{-1}$ [11].

Při alergických reakcích může reakce organismu vyústit až v anafylaktický šok - kožní příznaky, dýchací potíže, při i.v. podání ATB. Anafylaktický šok vzniká při vstupu alergenu do krevního proudu, kde dochází k reakci s antigenem, který se váže na imunoglobuliny E a začínají se vytvářet histaminové látky, které působí výraznou propustnost cév, dochází ke spasmu hladkých svalů a bronchů. Anafylaktický šok je způsoben prudkým snížením obíhající tekutiny, tedy výrazným poklesem krevního tlaku. Pacient může zemřít.

Široké použití CAP v očních kapkách v Evropě se zdá mít minimální vliv na případný vznik anémie [6] a vstřebání léku do systémového oběhu se zdá být malé.

ATB může interagovat s jinými léčivy nebo chemoterapeutiky (diuretika, kardiotonika, antidiabetika). Princip lékové interakce spočívá v tom, že CAP snižuje jaterní biotransformace jiných léčiv tím, že ireverzibilně inhibuje jaterní mikrosomální cytochrom P450 a tím prodlužuje poločasy eliminace mnoha léčiv, která jsou tímto systémem metabolizována. Těmito léky jsou např. dicumarol, fenytoin, chlorpropamid a tolbutamid. Naopak jiné léky mohou měnit eliminační čas CAP. Dlouhodobé podávání fenobarbitalu nebo podání rifampinu snižuje biologický poločas působení CAP pravděpodobně díky indukci biotransformujících enzymů a může vést k subterapeutickým koncentracím léčiva [7].

Chloramfenikol obsahuje nitrobenzenové jádro, a proto je řazen mezi potencionální karcinogeny [9].

1.2.4. Farmakokinetika CAP

Chloramfenikol se perorálně podává ve dvou formách: aktivní forma chloramfenikolu ($M_r = 323,13$) a nebo jeho inaktivní prolátka chloramfenikolpalmitát ($M_r = 561,54$, ve vodě nerozpustný).

Maximální koncentrace chloramfenikolu v séru se po perorálním podání projeví za 1-3 hodiny [3]. Za normálních fyziologických podmínek jsou esterové vazby CAPpalmitátu (neúčinné látky) hydrolyzovány pankreatickými lipázami velmi rychle a téměř kompletně v duodenu [9]. Volný CAP je pak absorbován gastrointestinálním traktem. Po podání 1 g dávky se během 2-3 hodin objeví sérová koncentrace antibiotika 10 až 13 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Po 2g dávce je to 20 – 30 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ nebo-li 29 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti [6]. U novorozenců nebo pacientů s poruchou gastrointestinálního traktu je biologická dostupnost větší pro CAP než pro CAPpalmitát, neboť u nich nedochází ke kompletní hydrolyze palmitátu.

Pro parenterální aplikaci se připravuje ve vodě rozpustná, inaktivní sodná sůl chloramfenikolsukcinátu ($M_r = 445,18$), která se hydrolyzuje na volný CAP pravděpodobně esterázami v játrech, ledvinách a plicích. Chloramfenikolsukcinát se z plazmy vylučuje přes ledviny. Tato renální clearance prolátky může ovlivnit celkovou biologickou dostupnost chloramfenikolu, protože 20 % až 30 % dávky může být exkretováno před vlastní hydrolýzou. Doporučuje se podávat CAP, pokud je to možné, pouze perorálně.

CAP je velmi dobře distribuován do všech tělních tekutin a snadno dosahuje terapeutických koncentrací v centrální nervové soustavě, kdy hodnoty dosahují hladiny 60 % z obsahu v plazmě. Lék se může v mozkové tkáni kumulovat.

Chloramfenikol proniká do mléka a přes placentu, kde dosahuje až 75% koncentrace jako v plazmě matky. Okolo 50 % CAP je vázáno na plazmatické proteiny, a tak je distribuováno do celého těla. Biologický poločas aktivní látky v dospělém lidském organismu s normálními renálními a jaterními funkcemi jsou 4 hodiny. U novorozenců to může být 9-12 hodin.

Hlavní cesta eliminace je přes jaterní metabolismus konjugace s kyselinou glukuronovou za vzniku neaktivního glukuronidu, který je dále glomerulární exkrecí vyloučen močí. Během 24 hodin je tak 75 % - 90 % perorálně podané dávky vyloučeno močí, z čehož okolo 5 % - 15 % je v biologicky aktivní nezměněné formě [6].

Pro rozdílnost v metabolismu novorozenců a dětí oproti dospělému organismu je nutné sledovat během léčby koncentrace CAP v plasmě.

1.2.5.Charakteristika studované látky

Chloramfenikol

Identifikace sloučeniny

C.A.S.název 13(2,2-Dichloro-*N*-[(*aR*,*bR*)-*b*-hydroxy-*a*-hydroxymethyl-4-nitrophenethyl]acetamid)

C.A.S. registrační číslo: 56-75-7

Sumární vzorec: C₁₁H₁₂Cl₂N₂O₅

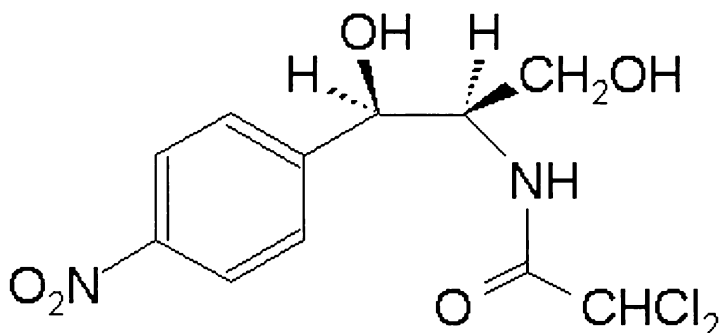
Zkratka: CAP

Relativní molekulová hmotnost: 323,13

Bod tání : 150,5 °C – 151,5 °C

Jiné názvy / synonyma: Amphenicol, Azramycine, Biomicin, Chemicetin, Chemyzin, Chloromycetin, Chloroptic, Chloramex, Chlorcol, Cloramffen, Detreomycin, D-threo-*N*-Dichloroacetyl-1-*p*-nitrophenyl-2-amino-1,3-propanediol, D-(-)-threo-*p*-Nitrophenyl-1-dichloroacetamido-2-propanediol-(1,3), Fenicol, Loromisan, Novochlorocap, Oftalent, Oleomycetin, Ophthochlor, Pentamycetin, Rivomycine, Septicol, Tifomycine, Tramina

Strukturní vzorec:



CAP je bílý, našedlý nebo žlutobílý prášek, který je tvořen jemnými krystalky, jehličkami nebo protáhlými destičkami [13]. Je citlivý na světlo. Při vysokém vakuu sublimuje. Nitroskupina se redukuje na aminovou. Aktivní je pouze jeden ze 4 isomerů a to alfa-R, beta-R (D-(-)-threo). CAP je rozpustný ve vodě, chloroformu, éteru, velmi dobře rozpustný je v propylenglykolu. Dále v 50% acetamidu, methanolu, ethanolu, buthanolu, etylacetátu a acetonu. Je nerozpustný v benzenu, petroletheru a v rostlinných olejích [9]. Je stabilní v neutrálních nebo slabě kyselých roztocích. Alkoholový roztok CAP je pravotočivý a etylacetátový roztok je levotočivý.

Struktura chloramfenikolu je poměrně jednoduchá v porovnání s ostatními antibiotiky. Vychází z kyseliny šikimové, zvláštností mezi přírodními látkami je zabudování chloru a nitroskupiny do molekuly. Dříve se CAP vyráběl biosynteticky. Díky jednoduché struktuře je možné toto antibiotikum připravovat chemickou syntézou z *p*-nitroethylbenzenu za vzniku *p*-nitroacetofenonu.

1.2.6. Metody stanovení

1.2.6.1. Regulace používání CAP

Jak bylo popsáno výše, CAP je antibiotikum toxické na více úrovních a používání CAP ve veterinární medicíně u hospodářských zvířat vede k výskytu reziduí tohoto antibiotika v potravinách, proto je nutno jeho používání regulovat. Neexistují žádné studie, které by udávaly jaké minimální množství chloramfenikolu může způsobit aplastickou anémii. Proto v roce 1969 FAO/WHO odborná komise pro antibiotika doporučila nulovou hladinu reziduí CAP v masné produkci [1]. Francie například vyloučila toto antibiotikum z trhu po mnoha letech používání až v roce 1978 v důsledku toho, že způsobil smrtelné onemocnění u několika jednotlivců [14].

V Evropské unii, Kanadě a USA je aplikace chloramfenikolu na hospodářská zvířata zakázána [15, 16]. Ve veterinární medicíně bylo používání CAP v EU zakázáno v roce 1994 [17]. Z rozhodnutí Evropské unie Evropská komise dle direktiva 1430/94/ECC ustanovila, že CAP rezidua v masných a mléčných výrobcích musí být pod hladinou $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Proto je potřeba dostatečně citlivých metod pro přísnou kontrolu této látky [18].

Toto antibiotikum se také často používá ve včelařství ke kontrole onemocnění způsobeného bakterií *Paenibacillus larvae* (mor včelího plodu) [19]. Proto je třeba kontrolovat i včelařské výrobky především dovážené z Asie.

Vzhledem k rozdílným legislativám ve světě je nutné sledovat výskyt reziduí CAP v potravinách, neboť se CAP stále používá například v jihovýchodní Asii. Z rozhodnutí Evropské komise určité rybářské a zemědělské produkty importované z Číny, Vietnamu nebo Indonésie určené ke konzumaci musí být testovány na potvrzení nepřítomnosti CAP reziduí [20]. Navíc se stává, že chloramfenikol bývá používán nelegálně [16].

Jsou hledány metody pro zjištění co nejnižších koncentrací CAP vzhledem k rozhodnutí EU (kritéria dle rozhodnutí 2002/657/EC)[14].

1.2.6.2. Metody používané ke stanovení CAP

Pro stanovení CAP bylo vyvinuto a popsáno mnoho metod. Mezi používané metody stanovení CAP patří imunoanalýzy, plynová chromatografie (GC), kapalinová chromatografie [21] a polarografie [22]. K identifikaci CAP se používá UV spektrofotometrie, heterogenní enzymová imunoanalýza (ELISA) a hmotnostní spektrometrie. Dále bylo popsáno stanovení CAP vysokoučinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), která je například spojená s UV detekcí [23], cyklickou voltametrií a planární chromatografií.

Stanovením CAP pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC/MS) lze dosáhnout detekčního limitu mezi 0,2 až 0,6 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ v různých vzorcích. Tato metoda je jednoduchá, rychlá a lze jí stanovit 40 vzorků za den [24].

Pro identifikaci a kvantifikaci reziduí v moči, ve vejcích a masu byla vyvinuta a validována metoda GC-MS. Pro stanovení CAP v moči byl nalezen detekční limit $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$, a pro maso a vejce je to $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Pro screening byla použita imunochemická metoda RIA (radioimunoanalýza).

Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem je aplikovatelná pro stanovení a potvrzení množství reziduí CAP v různých provedeních (GC-ECD, GC-MS-EI-SIM a GCMS-NCI-SIM) [25, 26]. Tyto techniky mohou detekovat CAP rezidua v množství $0,1\text{-}10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Dále jsou uvedena polarografická a voltametrická stanovení.

Při SW voltametrickém stanovení CAP na elektrochemicky aktivovaných uhlíkových vláknových mikroelektrodách je možné dosáhnout meze detekce $15 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($4,7\cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) a limitu stanovitelnosti $1,6\cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Tato metoda byla aplikována na vzorky mléka s různým obsahem tuku a od různých značek, které byly zakoupeny v obchodě. K vzorkům mléka byl přidán standardní přídavek o koncentraci $5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ k navýšení CAP na 64 a $320 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Bylo zjištěno, že není třeba aplikace žádné extrakční metody pro předpřečištění vzorku při stanovení ve mléce [16].

Metodou kapilární zónové elektroforézy s ampérometrickou detekcí na elektrodě z uhlíkových vláken je dosaženo limitu detekce $9,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol.dm}^{-3}$. V této metodě bylo pracováno se zásobním roztokem CAP v destilované vodě o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.dm}^{-3}$ [27].

Dále stanovení diferenční pulsní polarografií na mini a mikro kapkové rtuťové elektrodě. Detekční limit této metody je 0,5 ng. Pro kontrolu elektrochemické metody byla použita pro stejné vzorky ELISA. Obě metody jsou dostatečně citlivé a DPP metoda je spolehlivá a reprodukovatelná, ale vhodnější metodou k analýzám vzorků s CAP rezidui je díky menší časové náročnosti ELISA [28].

Stanovením CAP na uhlíkové modifikované elektrodě (Ni/C) je detekční limit $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.dm}^{-3}$ [29]. V jiné práci je uvedeno, že detekcí na kapkové rtuťové elektrodě DC amperometrií lze určit množství chloramfenikolu 1 ng [30].

Při stanovení vysokoúčinnou diferenční pulsní polarografií (HPDPP) je detekční limit okolo 3 ng.ml^{-1} . Nad 1 mg.ml^{-1} se objevují odchylky od linearity, neboť CAP se adsorbuje na rtuťovou elektrodu. Diferenční pulsní polarografie (DPP) byla vybrána k porovnání s polarografií s lineárním nárůstem potenciálu (DCP) z důvodů, že detekční limity mohou být 10 – 50 krát nižší než u DCP. V této práci je uveden detekční limit 0,3 ppm ($1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.dm}^{-3}$) pro metodu DCP a 10 ppb ($3 \cdot 10^{-8} \text{ mol.dm}^{-3}$) pro DPP. Za použití HPDPP se dosáhlo limitu detekce 3 ppb ($1 \cdot 10^{-8} \text{ mol.dm}^{-3}$). Je to výsledek srovnatelný s plynovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií [1].

1.2.7. Uhlíková pastová elektroda

Uhlíkové pastové elektrody jsou v elektrolýze používány od 60. let minulého století. První CPE byly připraveny roku 1958 R.N. Adamsem ve snaze získat elektrodu s obnovitelným povrchem, použitelnou pro anodické oxidace. Pozornost jim byla věnována hned od počátku, ale zájem o ně výrazně vzrostl až v osmdesátých letech, kdy začala být zkoumána i modifikace elektrod jednoduše přimícháním látek k získání nových vlastností elektrod. Tento způsob modifikace je mnohem jednodušší než podobná úprava pevných elektrod [2].

V dnešní době se CPE uplatňují při stanovení stopových množství kovů v iontových formách a při organické analýze, dále CPE mohou být využity pro fyzikálně-chemické studie i pro výzkum a stanovení biologicky důležitých látek. Z hlediska citlivosti jsou vhodné především techniky voltametrické rozpouštěcí analýzy. Využití CPE se však uplatní i v technikách jako ampérometrie, chronopotenciometrie, coulometrie [31].

CPE lze považovat za zvláštní typ pevných elektrod. Patří tedy do skupiny s běžnými uhlíkovými elektrodami (např. skelný uhlík, pyrolytický grafit aj.) a elektrodami z ušlechtilých kovů (Pt, Au nebo Ag). Uhlíková pasta není kompaktním materiálem, avšak CPE bývají zařazovány mezi pevné elektrody z důvodů obecně podobných elektrochemických charakteristik. Z hlediska potenciometrických měření však vykazují vlastnosti elektrod s kapalinovými membránami. Někdy bývají označovány jako tzv. kompozitní elektrody, protože na rozdíl od jednoduchých elektrod (C, Pt, Au) obsahují složku vodivou (uhlík) i izolační (pojivo). V současnosti je upřednostňováno klasifikovat CPE jako heterogenní uhlíkové elektrody s kapalným pojivem [32].

Pastové elektrody rozdělujeme na nemodifikované či modifikované. Pasty nazývané nemodifikované jsou binární směsi uhlíkového prášku a pojiva.

Uhlíkový prášek je elektroaktivní částí pasty. Grafitový prášek je z mikroskopických částic vysoké čistoty a důležitým požadavkem je stejná velikost částic (v jednotkách až desítkách mikrometrů), příznivá distribuce velikosti částic a nízká absorpční schopnost. Takovýto materiál je možno běžně zakoupit od distributorů jako je *Aldrich*, *Sigma*, *Fluka* nebo *Riedel-de-Haen* [2]. Obvykle se uhlíkový prášek jinak nezpracovává. V současné době se nejvíce používá skelný uhlík, který má neporézní částice o průměru v jednotkách μm [33].

Pojivem bývá nepolární organická kapalina. Nejpoužívanější organické kapaliny jsou parafínové a minerální oleje, jako například Nujol (*Aldrich*) a Uvasol (*Merck*). Tyto nepolární kapaliny splňují důležitá kritéria pro neelektrolytická pojiva: jsou inertní chemicky i elektrochemicky, málo těkavé, s vodou nemísitelné a výsledná pasta má charakter homogenní jemné konzistence. I když se pastovací kapalina elektrochemické reakce neúčastní, ovlivňuje některé vlastnosti elektrody jako celku [34]. Mají ovšem také méně vhodné vlastnosti a to, že pasty s těmito oleji jsou v roztocích s organickým rozpouštědlem méně odolné, mohou se jím rozkládat. Pro tyto podmínky bylo dosaženo dobrých výsledků při použití past se silikonovým olejem. Další skupinou pojidel mohou být organofosfáty nebo se například mohou používat i některé estery [33].

Základem modifikovaných past je obvykle jako u nemodifikovaných CPE směs práškového grafitu a neelektrolytické pojivo. Další součástí ve směsi je modifikátor. Obvykle bývá přítomný pouze jeden modifikátor, ale pasty mohou být modifikovány dvěma i více složkami. Množství modifikátoru se pohybuje v rozmezí 10 - 30 % (m/m), v závislosti na charakteru modifikující složky a schopnosti vytvořit dostatečně aktivní pastu. Modifikace lze aplikovat na celý objem pasty, kdy elektroda pak slouží obvykle selektivně pro určitou látku nebo lze alternovat jen povrchovou vrstvu uhlíkové pasty *in situ*. Vrstva může být po analýze jedné látky odstraněna a uhlíková pastová elektroda pak později použita ke zcela jinému účelu.

Existují také CPE tvořené směsí uhlíkového prášku a roztoku silného elektrolytu například 1M HCl nebo H_2SO_4 [32].

Pro většinu aplikací jsou klasické uhlíkové pasty z grafitového prášku a parafínových olejů dostačující a jsou vhodné i pro oblíbené modifikace past.

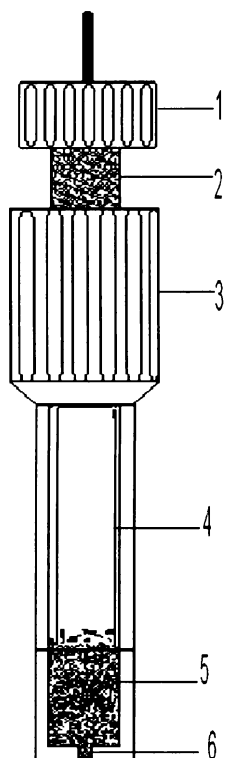
Již namíchané a připravené uhlíkové pasty jsou komerčně dostupné (*Metrohm*), přesto tradiční příprava v třecí misce pro homogenizaci pasty je stále více preferována. Oblíbenost laboratorní přípravy vlastnoručně připravené pasty analytikem spočívá v možnosti výběru složek směsi a jejich poměru, který se hodí pro jeho účel. Pro přípravu past modifikovaných to platí tím více.

Pro přípravu uhlíkové pasty se doporučuje zvolit poměr grafit : kapalina 1,0 g : 0,4 ml. Vznikne tak hustá pasta, která se příliš nelepí ani nedrolí. Zvětšováním podílu uhlíkového prášku se vlastnosti uhlíkové pasty přibližují vlastnostem pevných elektrod – vzrůstá zbytkový proud, ale i zároveň odezva detektoru.

Uhlíková pasta se vpravuje do vhodného elektrodového pouzdra. Na obr. 2 je zobrazena nejčastěji používaná pístová elektroda, která byla použita pro měření v této práci. Tělo elektrody se plní spodní částí, v které je při vyšroubované poloze pístu dutina, tam po malých množstvích s důkladným péčováním připravenou pastu vměstnáme. S měřícím obvodem se elektroda spojí přes zdířku v teflonové hlavě.

Tělo elektrody se různí, může být mikro či makro uspořádání. Používaná těla elektrod mohou být z PVC, skleněná, teflonová, jsou duté a mohou být jednoduše plněny novou uhlíkovou pastou. Komerčně dostupným produktem je *Metrohm* [2]. Pro běžné použití a pro většinu elektrochemických měření se průměr otvoru v těle elektrody pohybuje od 2 do 10 mm, což je zároveň i průměr povrchu elektrody. Pro voltametrická měření jsou nejvhodnější koncovky s průměrem otvoru 1 až 2 mm. Na větším povrchu se nepříznivě projevuje vzrůst zbytkových proudů neboť příliš velká plocha se nedostatečně polarizuje. Velký pracovní povrch se hodí pro coulometrická nebo potenciometrická měření [32].

Jednoduchá konstrukce elektrody, kdy po naplnění je pasta vytlačována pomocí pístu se závitem, umožňuje snadné a rychlé obnovování povrchu elektrody otřením o navlhčený filtrační papír a odstranění většího



Obr. 2 Uhlíková pastová elektroda (CPE). Otočná hlava (1), závit (2), tělo elektrody (3), ocelový píst (4), náplň uhlíkové elektrody (5), koncový otvor (6).

množství pasty, je-li potřeba například při měření látky, která se rychle adsorbuje na pastu. Získaný povrch však nemá stejnou kvalitu jako povrch pevných elektrod, což je příčinou menší reprodukovatelnosti měření [34].

Připravené pasty se mnohdy ustálí až po určité době (cca 24 hodin), zřejmě v důsledku následné samovolné homogenizace. Elektrody naplněné čerstvou pastou je vhodnější nechat v klidu alespoň přes noc. Naplněnou elektrodu však není vhodné ponechat příliš dlouho na vzduchu, neboť pasta pozvolna vysychá. Mezi měřeními je vhodné elektrodu přechovávat ponořenou v nádobce s destilovanou vodou.

Po spotřebování celé pasty by se pouzdro mělo vyčistit rozpouštědlem, například acetonem. Lze ho poté jednoduše znovu naplnit.

Elektrochemické vlastnosti CPE jsou závislé na projevu jednotlivých komponent uhlíkové pasty. Typ a množství použitého uhlíku má vliv na velikost zbytkových proudů. Může se také stát, že pastovací kapalina elektrodové děje komplikuje svými fyzikálně chemickými interakcemi s analytem nebo dalšími složkami v roztoku.

Typ zvolené kapaliny má vliv na kinetiku některých elektrochemických dějů, je to především přepětí vůči redox-systémům H^+/H a O^2/OH^- . Obecně lze říci, že s vyšším množstvím kapaliny se zvyšuje přepětí elektrody a zpomaluje se přenos náboje.

Na velmi nízké hodnoty zbytkových proudů u CPE má vliv také pravděpodobně přítomnost pojiva, čím vyšší je podíl pastovací kapaliny, tím je nižší pozadí signálu. Kapalina však naopak může negativně působit extrakčním efektem, a to hlavně v případě, kdy jsou analyzované látky málo polární. Extrakce do pastovací kapaliny lze využít k prekoncentraci analytů a umožnit jejich stanovení ve velmi nízkých koncentracích. Při běžných analýzách je extrakce nežádoucím jevem. V případě práce ve směsných vodně-methanolických prostředích může být pasta narušena naopak vymýváním pojiva [35].

CPE mají výhodu, že na nich je velké přepětí kyslíku, takže je možné sledovat elektrodové reakce až k velmi pozitivním potenciálům a stanovit látky na základě jejich anodické oxidace. Katodická oblast je např. se srovnáním s rtuťovou elektrodou omezená. Při použití CPE pro anodické oxidace nedochází k ireverzibilní tvorbě oxidů na povrchu jako u elektrod z kovových materiálů.

CPE se svým potenciálovým rozsahem podobají pevným elektrodám, například z platiny nebo skelného uhlíku. V neutrálních roztocích se oblast použitelná pro měření pohybuje mezi -1,3 až +1,4 V, v kyselých nebo zásaditých roztocích se posouvá o několik desetin voltu. Výhodou CPE je, že katodický i anodický potenciálový limit lze ovlivnit úpravou uhlíkového prášku i typem použité kapaliny [32].

Měření v katodické oblasti komplikuje přítomnost kyslíku rozpuštěného v pastě [33]. Rozpuštěný kyslík podléhá elektrodové redukci a vykazuje

nezanedbatelný proud. Signál se projevuje rušivě v katodické oblasti potenciálů. Kyslík je přítomen v uhlíkovém prášku, navíc se pravděpodobně další vnáší při tvorbě pasty a může být také rozpuštěn v roztoku s analytem. Úspěchu při řešení problému s kyslíkem se dosáhlo použitím polárnější pastovací kapaliny (trikresylfosfátu) se silně lipofilními vlastnostmi [32].

Důležitou charakteristikou CPE je reprodukovatelnost odezvy. Vzhledem k heterogenitě pasty je povrch špatně definovatelný a vykazuje horší reprodukovatelnost oproti rtuťové elektrodě nebo elektrodám z kompaktních materiálů a je kolem 5% *rel.*

Příprava pevných elektrod je delší oproti rtuťové kapkové elektrodě, ale používání je snadné díky rychlosti obnovování povrchu

CPE jsou nevhodné pro studie, kdy je potřeba znát velikost aktivního povrchu (některé fyzikálně-chemické studie). U analytických aplikací, kdy se porovnává velikost signálů standardu a neznámého vzorku se standardním přídatkem není znalost velikosti povrchu důležitá [32].

Závěrem lze říci, že výhodou uhlíkových pastových elektrod je nízká hodnota zbytkových proudů, jednoduché obnovení povrchu elektrody a nízká cena a možnost snadné chemické modifikace. Nevýhodná je naopak omezená možnost použití elektrody v katodické oblasti a při měření v organických rozpouštědlech a nižší reprodukovatelnost měření.

2. Experimentální část

2.1. Chemikálie:

Chloramfenikol (Léčiva, a.s., Praha)

Zásobní roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven rozpuštěním 32,3 mg CAP v deionizované vodě a doplněním na celkový objem 100 ml.

Roztoky o nižších koncentracích byly připraveny přesným ředěním tohoto zásobního roztoku Brittonovým-Robinsonovým (BR) pufrům na digitálním pH-metru. Všechny roztoky byly uchovávány ve tmě za laboratorní teploty.

Další použité chemikálie

Deionizovaná voda (Millipore Q-plus Systeme, Millipore)

Kyselina boritá (p.a., Lachema Brno, ČR)

Kyselina fosforečná (p.a., Lachema Brno, ČR)

Hydroxid sodný (p.a., Lachema Brno, ČR)

Minerální olej (Fluka, Buchs)

Octová kyselina (p.a., Lachema Brno, ČR)

Uhlíkový prášek (Alfa Aesar)

Brittonův - Robinsonův tlumivý roztok

A. Kyselá složka byla připravena z 2,74 g H_3BO_3 , 2,7 ml koncentrované H_3PO_4 (84%, $\rho = 1,71$) a 2,3 ml CH_3COOH (99,8%, $\rho = 1,06$) v jednolitrové odměrné baňce doplněna po rysku deionizovanou vodou.

B. Alkalická složka pufru byla připravena rozpuštěním 8 g NaOH v deionizované vodě do jednolitrové odměrné baňky. BR tlumivé roztoky o příslušném pH byly připravovány smícháním složky A a B.

Uhlíková pasta

Připravena z 250 mg uhlíkového prášku Alfa Aesar a 100 μ l minerálního oleje Fluka.

2.2. Aparatura:

Voltametrická měření byla provedena na sestavě Eco-Tribo Polarograf se softwarem Polar Pro verze 5 (Polaro-Sensors, Praha). Program pracoval v operačním systému Windows XP (Microsoft Corp.).

Jednotlivá měření byla provedena vždy v tříelektrodeovém systému. Jako pracovní elektroda byla použita uhlíková pastová elektroda (CPE), referentní byla použita argentchloridová elektroda s 3 mol.dm⁻³ KCl a jako pomocná platinová drátková elektroda.

Byla použita rychlost nárůstu potenciálu 20 mV.s⁻¹ a modulační amplituda -50 mV.

Měření pH byla provedena na digitálním přístroji Conductivity and pH meter 4330 (Jenway, Anglie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ PCH 2411). Přístroj byl kalibrován pomocí standardních vodných pufrů.

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Pye-Unicam SP8-400 UV/VIS spectrophotometer (Cambridge, Velká Británie) v křemenných kyvetách měrné tloušťky 0,5 cm.

2.2.1. Pracovní elektroda - CPE

Pro stanovení chloramfenikolu byla použita uhlíková pasta, která byla připravena v třecí misce velmi důkladným smícháním 250 mg uhlíkového prášku Alfa Aesar a 100 μl parafínového oleje. Pastou bylo naplněno tělo elektrody (průměr těla elektrody 10 mm, průměr disku 2 mm, Vývojové dílny Univerzity Pardubice). Regenerace elektrody byla prováděna otřením elektrody o navlhčený filtrační papír a pasta byla vytlačována pomocí pístu se závitem.

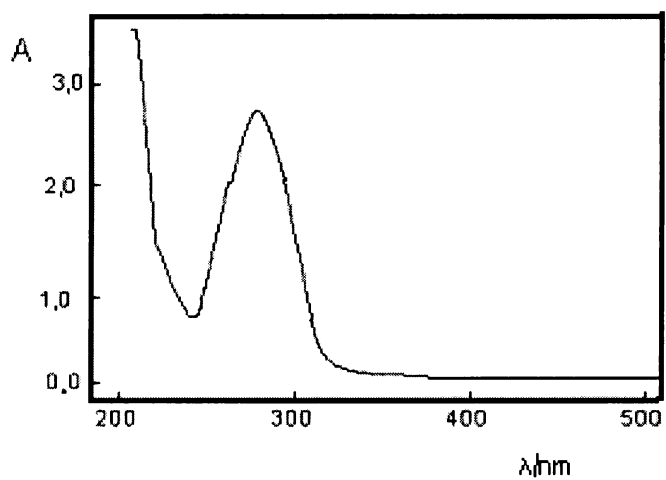
2.3. Stálost zásobního roztoku

Stálost zásobního roztoku chloramfenikolu byla sledovaná spektrofotometricky v křemenných kyvetách o tloušťce 0,5 cm. Absorbance roztoku zkoumané látky byla měřena při vlnové délce, kde zkoumaný analyt měl absorpční maximum. Koncentrace roztoku byla $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Referentní kyveta obsahovala deionizovanou vodu. Absorpční spektrum je uvedeno na obr. 3. Vlnová délka absorpčního maxima byla 278 nm.

Výsledky měření jsou zaznamenány v tab. 1, z níž je vidět, že během dvou měsíců nedošlo k významnému poklesu koncentrace CAP. Zásobní roztok chloramfenikolu je tedy při uchovávání ve tmě poměrně stálý.

Tab. 1 Stálost zásobního roztoku CAP

t, dny	CAP, $\lambda_{\max} = 278 \text{ nm}$	
	A	%
1	2,71	100,0
5	2,71	100,0
15	2,70	99,6
30	2,69	99,3
45	2,68	98,9
60	2,64	97,4



Obr. 3. Absorpční spektrum roztoku CAP ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) ve vodě. Měřeno proti vodě v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 0,5 cm.

2.4. Pracovní postupy

Ke stanovení CAP byla použita nemodifikovaná uhlíková elektroda, zvolenými metodami byly voltametrie s lineárním nárůstem potenciálu, diferenční pulsní voltametrie. Vzhledem k povaze reakce CAP (nitroskupina chloramfenikolu se redukuje na aminoskupinu), bylo třeba odstranit kyslík z roztoku, neboť při katodických redukcích na CPE dochází k redukci kyslíku, který vykazuje nezanedbatelný signál.

Měření bylo provedeno v tříelektrodevém uspořádání:

pracovní elektroda: uhlíková pastová elektroda

referentní elektroda: argentchloridová (3 mol.dm^{-3} KCl) elektroda

pomocná elektroda: platinová drátková

Byla použita rychlost nárůstu potenciálu 20 mV.s^{-1} a modulační amplituda -50 mV .

Před začátkem měření bylo třeba připravit uhlíkovou pastovou elektrodu. Dokonale zhomogenizovaná pasta (příprava viz kapitola 2.2.1.) byla naplněna do těla elektrody z PVC, ze kterého byla vytlačována pomocí nerezového pístu se závitem. Elektroda byla po každém měření oplachována destilovanou vodou, poté byla část pasty vytlačena a pracovní povrch byl setřen o navlhčený filtrační papír. Množství vytlačené pasty bylo zjištěno experimentálně, tak aby případné naadsorbované množství CAP nerušilo signál dalšího měření. Obnovený povrch uhlíkové pastové elektrody byl udržován čistý a rovný. Když se s pastou neměřilo byla uchovávaná v malém množství deionizované vody.

Při voltametrických měřeních bylo odpipetováno příslušné množství analytu ze zásobního roztoku CAP o koncentraci $1.10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ do 10ml odměrné baňky a roztok byl doplněn po rysku Brittonovým - Robinsonovým pufrem o příslušné hodnotě pH.

Takto připravený roztok byl promíchán a převeden do voltametrické nádoby. Roztok byl zbaven kyslíku 7 minutovým probubláním dusíkem před každým měřením. Po odstranění kyslíku byl proveden záznam voltametrické křivky. Všechny křivky byly proměřeny alespoň čtyřikrát. Veškerá měření byla prováděna při laboratorní teplotě. Výšky píků byly měřeny od spojnice minim po jejich stranách.

Při adsorpční rozpouštěcí voltametii byla akumulace prováděna v míchaném roztoku. Po skončení akumulace bylo míchání vypnuto a po 10 s byl v ustáleném roztoku proveden záznam voltametrické křivky.

Za těchto experimentálních podmínek byly naměřeny veškeré voltametrické křivky.

3. Stanovení CAP DC voltametrií

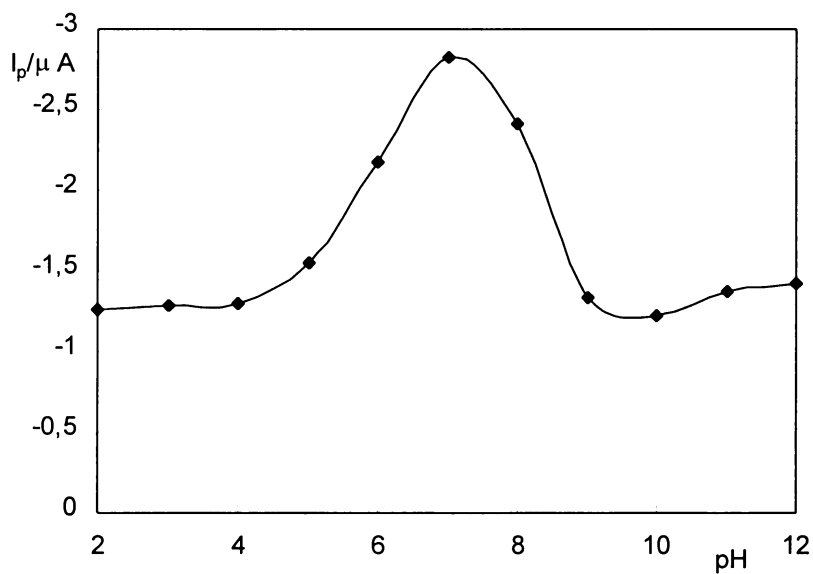
3.1. Vliv pH

Nejprve byl studován vliv pH na voltametrické chování CAP při voltametrické měření s lineárním nárůstem potenciálu na CPE v prostředí BR pufru o pH v rozmezí 2,0 až 12,0. Koncentrace studované látky byla $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Na obr. 4 je vyobrazena křivka znázorňující závislost proudu píku I_p na rostoucím pH. Je patrné, že I_p narůstá až k hodnotě pH 7, kde je nejvyšší a poté při měření vyšších pH zase hodnoty I_p klesají. Zjištěné závislosti potenciálu píku (E_p) a proudu píku (I_p) na pH jsou uvedeny v tab. 2.

Na obr. 5 a 6 jsou znázorněny vybrané DC voltamogramy studované látky v BR pufru o různém pH, ze kterých je také patrné, že nejvyšší a nejostřejší pík (I_p) byl nalezen při hodnotě pH 7.

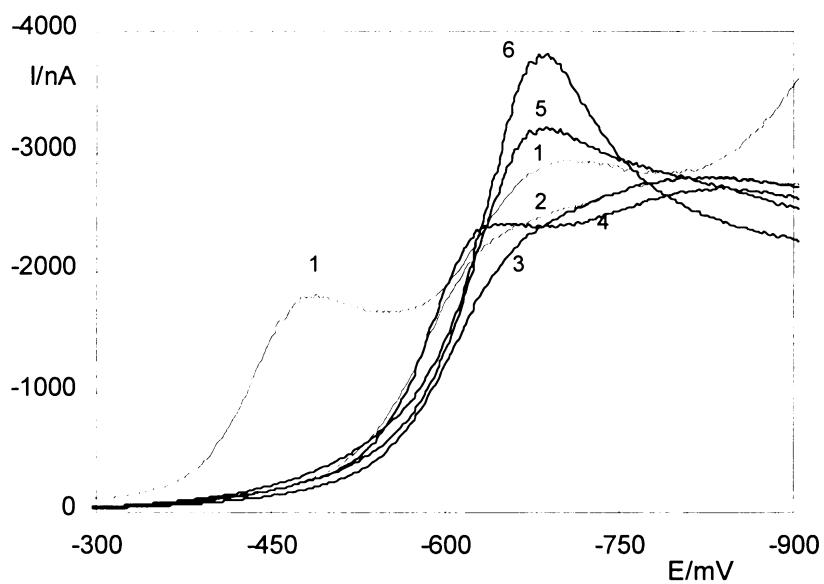
Na obr. 7 je na ukázkou zobrazena voltametrická křivka CAP s nedostatečně odstraněným kyslíkem, který tvoří druhý pík na voltametrické křivce.



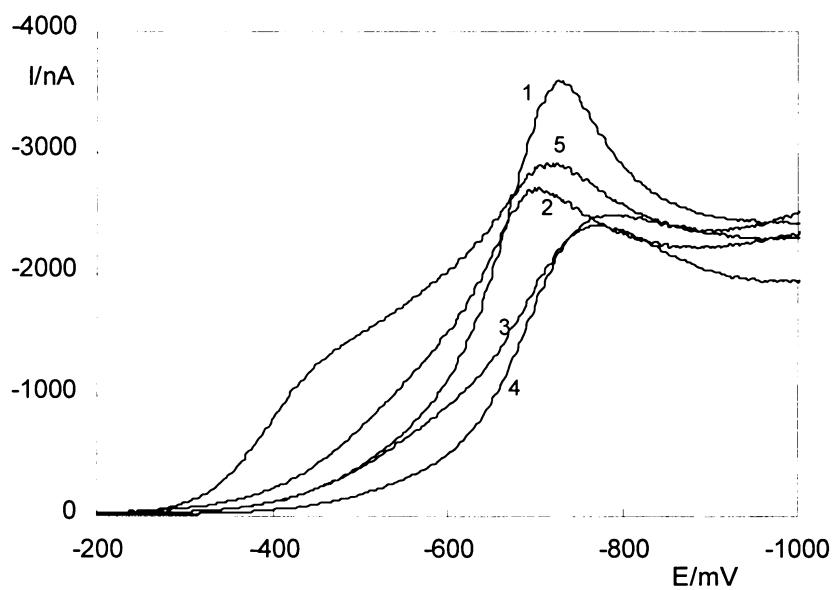
Obr. 4 Závislost proudu píku I_p 1.10^{-4} mol.dm⁻³ CAP na pH. Měřeno v prostředí BR pufru metodou DCV na CPE.

Tab. 2 Vliv pH na DC voltamogramy CAP o koncentraci 1.10^{-4} mol.dm⁻³ v prostředí BR pufru na CPE.

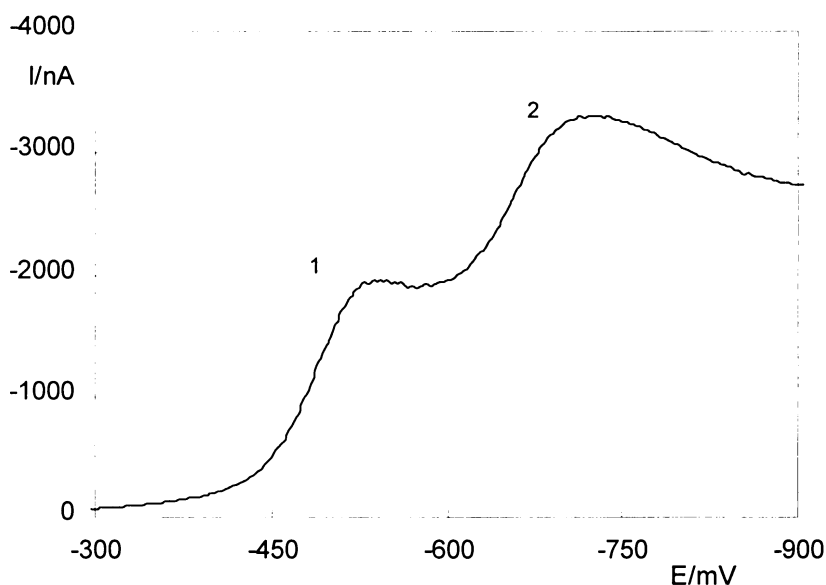
pH BR pufru	I_p (nA)	E_p (mV)
2,0	-1265	-678
3,0	-1287	-699
4,0	-1304	-654
5,0	-1553	-635
6,0	-2172	-683
7,0	-2829	-692
8,0	-2411	-729
9,0	-1334	-695
10,0	-1224	-766
11,0	-1374	-727
12,0	-1422	-715



Obr. 5 Voltamogramy CAP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) měřené technikou DC voltametrie na nemodifikované CPE v prostředí BR pufru o pH 2 – 7. pH 2 (1), pH 3 (2), pH 4 (3), pH 5 (4), pH 6 (5), pH 7 (6).



Obr. 6 Voltamogramy CAP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) měřené technikou DC voltametrie na nemodifikované CPE v prostředí BR pufru o pH 8 – 12. pH 8 (1), pH 9 (2), pH 10 (3), pH 11 (4), pH 12 (5).



Obr. 7 Voltamogram CAP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) měřený technikou DC voltametrie na nemodifikované CPE v prostředí BR pufru o pH 3. Kyslíkový pík (1), CAP pík (2).

3.2. Koncentrační závislosti

Závislosti proudu píku (I_p) na koncentraci CAP byla proměřena technikou DCV na CPE v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ až $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v nalezeném nejvhodnějším prostředí BR pufru pH 7.

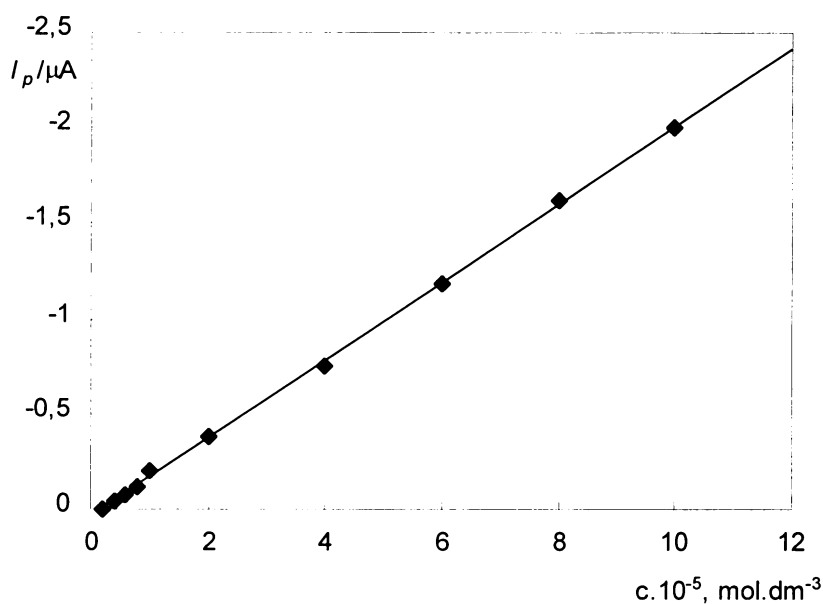
Kalibrační přímka CAP je uvedena na obr. 8 v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $(2-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Jednotlivé body představují průměrnou hodnotu ze tří měření.

Parametry kalibrační přímky vypočtené metodou lineární regrese jsou uvedeny v tab. 3.

Na obr. 9 jsou uvedeny pro ilustraci DC voltamogramy studované látky pro koncentrační rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a na obr. 10 v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Z uvedených křivek vyplývá, že s rostoucí koncentrací CAP se zvyšují píky proudu I_p .

Z výsledků měření vyplývá, že kalibrační závislosti jsou za těchto podmínek lineární a potenciál nezávisí na koncentraci.

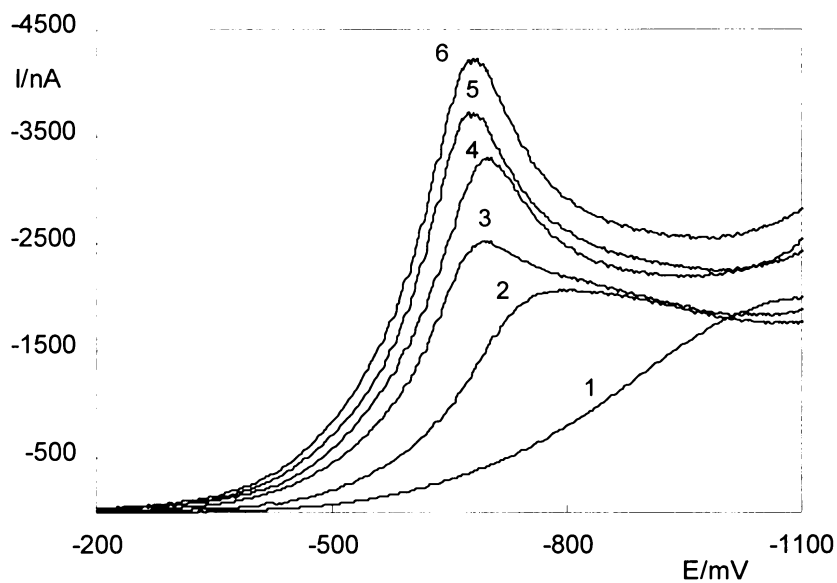
Nejnižší mez stanovitelnosti je $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.



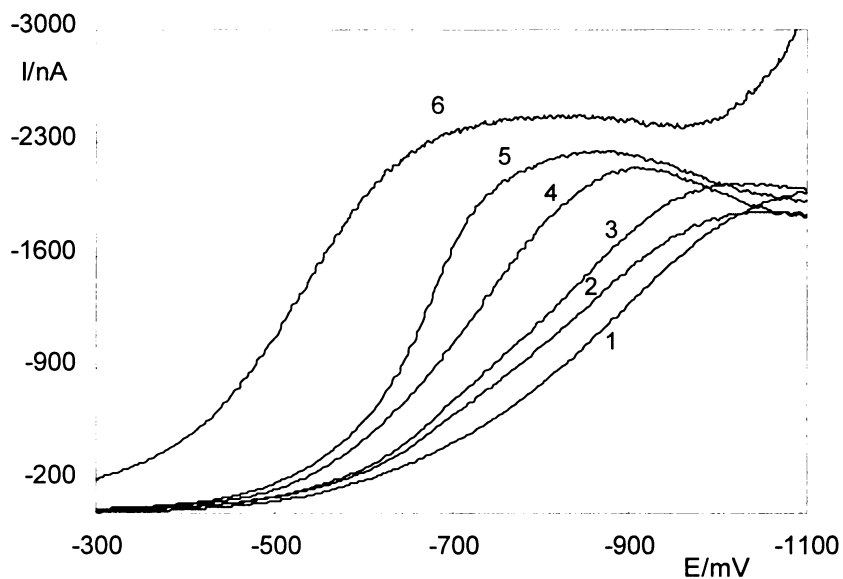
Obr. 8 Závislost proudu píku I_p měřeného technikou DCV na CPE v prostředí BR pufru o pH 7. Koncentrační rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 10 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CAP.

Tab.3 Parametry kalibrační přímky CAP měřené technikou DCV na CPE v prostředí BR pufru.

$c \text{ (mol} \cdot \text{dm}^{-3}\text{)}$	směrnice ($\mu\text{A} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$)	úsek (μA)	Korel.koef.	$L_Q \text{ (mol} \cdot \text{dm}^{-3}\text{)}$
$2 \cdot 10^{-6} - 10 \cdot 10^{-5}$	-0,204	0,034	0.9994	$2 \cdot 10^{-6}$



Obr. 9 DC voltamogramy CAP v prostředí BR pufru o pH 7 měřené na CPE. Koncentrace CAP ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$): 0 (1), $2\cdot 10^{-5}$ (1), $4\cdot 10^{-5}$ (2), $6\cdot 10^{-5}$ (3), $8\cdot 10^{-5}$ (4), $10\cdot 10^{-5}$ (5).

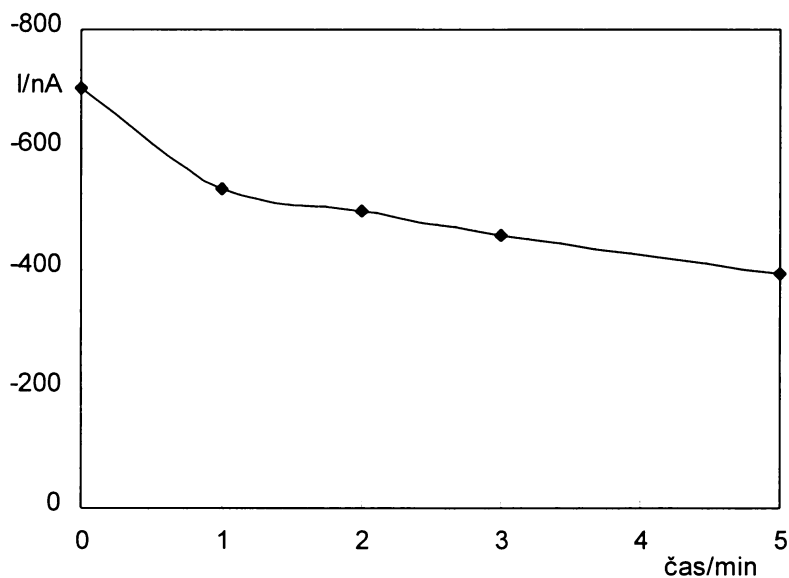


Obr. 10 DC voltamogramy CAP v prostředí BR pufru o pH 7 měřené na CPE. Koncentrace CAP ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$): 0 (1), $2\cdot 10^{-6}$ (2), $4\cdot 10^{-6}$ (3), $6\cdot 10^{-6}$ (4), $8\cdot 10^{-6}$ (5), $10\cdot 10^{-6}$ (6).

3.3. DC adsorpční rozpouštěcí voltametrie

Pro dosažení nižší meze stanovitelnosti byl studován vliv doby akumulace na proudu píku (I_p) CAP o koncentraci $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Adsorpční rozpouštěcí analýza byla provedena metodou DC adsorpční rozpouštěcí voltametrie (AdSV) na CPE v prostředí BR pufru o pH 7.

Jak je patrné z obr. 11, nebyla pozorována výraznější závislost výšky píku na době akumulace. Tudíž AdSV nelze využít ke zvýšení citlivosti metody stanovení CAP.



Obr. 11 Závislost proudu píku I_p na době akumulace CAP ($4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) v míchaném roztoku. Měření technikou DCV na CPE v prostředí BR pufru o pH 7.

4. Stanovení CAP diferenční pulsní voltametrií

4.1. Vliv pH

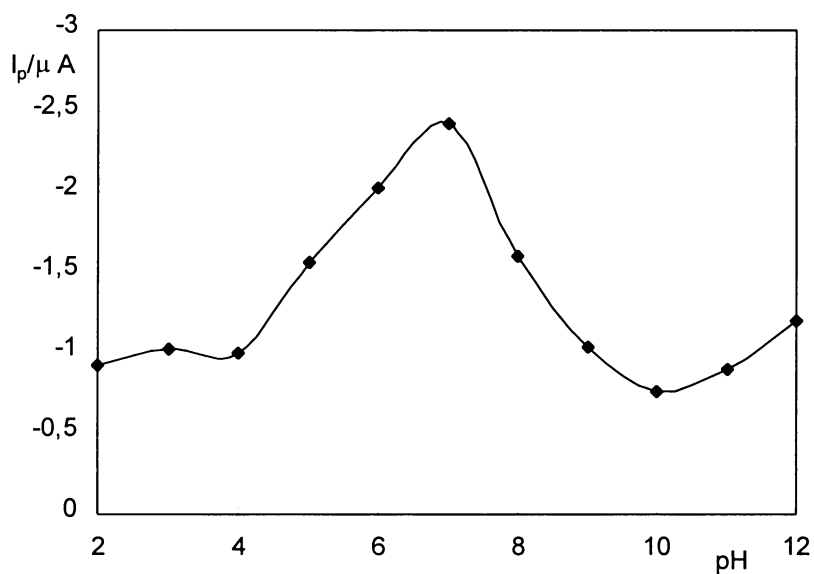
Nejprve byl studován vliv pH na voltametrické chování CAP diferenční pulsní voltametrií na CPE v prostředí BR pufru o pH v rozmezí 2,0 až 12,0. Koncentrace studované látky byla $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Na obr. 12 je vyobrazena křivka znázorňující závislost výšky píku I_p na rostoucím pH. Je patrné, že I_p narůstá až k hodnotě pH 7, kde je nejvyšší a posléze při vyšším pH zase hodnoty klesají.

Zjištěné závislosti potenciálu píku (E_p) a proudu píku (I_p) na pH jsou uvedeny v tab. 4.

Na obr. 13 a 14 jsou znázorněny vybrané DP voltamogramy studované látky v BR pufru o různém pH, ze kterých je také patrné, že nejvyšší a nejostřejší pík (I_p) byl nalezen při hodnotě pH 7.

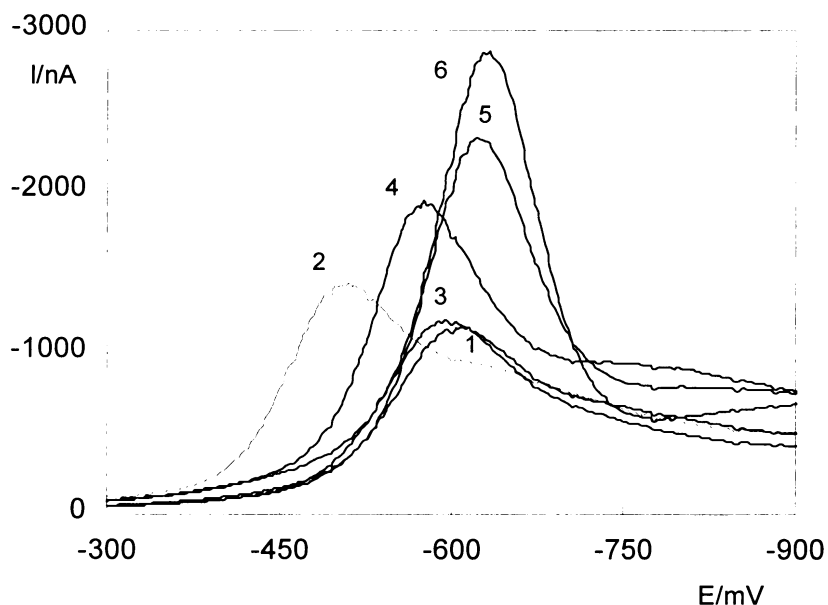
Na obr. 15 je na ukázkou zobrazena voltametrická křivka CAP s nedostatečně odstraněným kyslíkem, který tvoří druhý pík na voltametrické křivce.



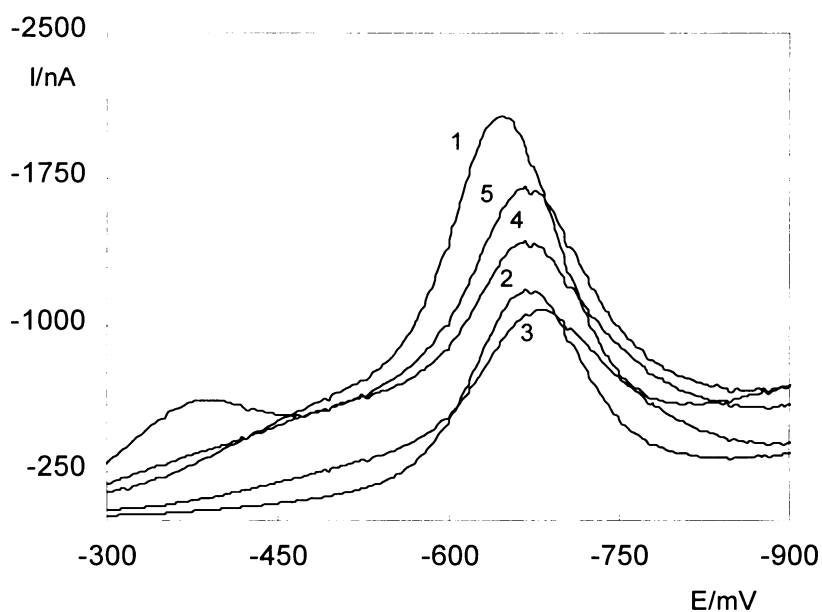
Obr. 12 Závislost proudu píku I_p $1 \cdot 10^{-4}$ mol.dm⁻³ na pH. Měřeno v prostředí BR pufru metodou DPV na CPE.

Tab. 4 Vliv pH na DP voltamogramy CAP o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol.dm⁻³ v prostředí BR pufru na CPE.

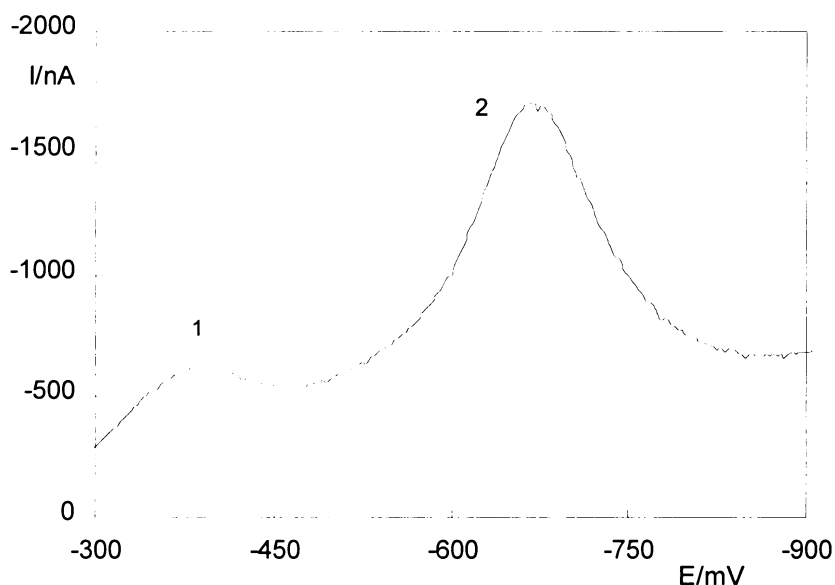
pH BR pufru	I_p (nA)	E_p (mV)
2,0	-920	-550
3,0	-1024	-497
4,0	-1002	-596
5,0	-1560	-583
6,0	-2026	-625
7,0	-2420	-636
8,0	-1597	-647
9,0	-1036	-675
10,0	-758	-686
11,0	-902	-673
12,0	-1201	-666



Obr. 13 Voltamogramy CAP ($c = 1.10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) měřené technikou DP voltametrie na nemodifikované CPE v prostředí BR pufru o pH 2 – 7. pH 2 (1), pH 3 (2), pH 4 (3), pH 5 (4), pH 6 (5), pH 7 (6).



Obr. 14 Voltamogramy CAP ($c = 1.10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) měřené technikou DP voltametrie na nemodifikované CPE v prostředí BR pufru o pH 8 – 12. pH 8 (1), pH 9 (2), pH 10 (3), pH 11 (4), pH 12 (5).



Obr. 15 Voltamogram CAP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) měřený technikou DP voltametrie na nemodifikované CPE v prostředí BR pufru o pH 12. Kyslíkový pík (1), CAP pík (2).

4.2. Koncentrační závislosti

Závislosti proudu píku (I_p) na koncentraci CAP byla proměřena technikou DPV na CPE v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ až $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v nalezeném nejvhodnějším prostředí BR pufru pH 7.

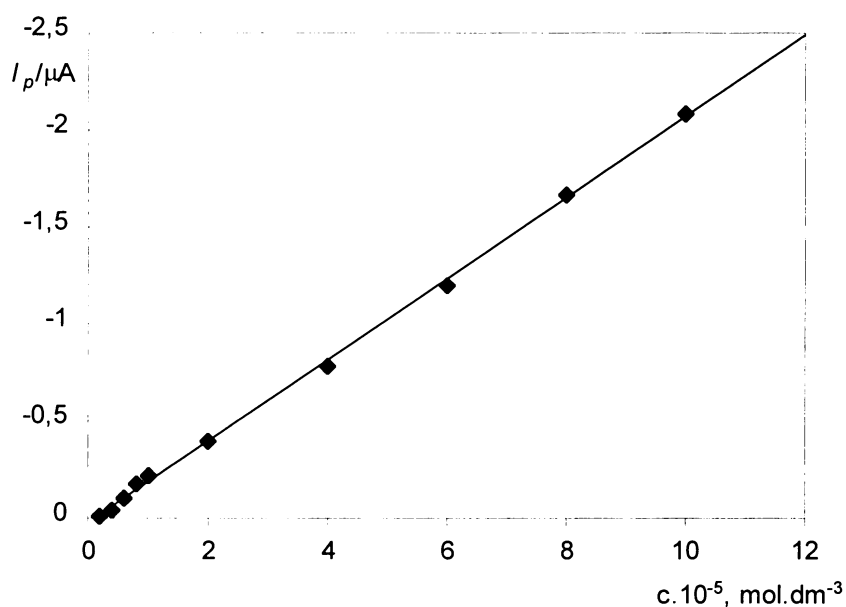
Kalibrační přímka CAP je uvedena na obr. 16 v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $(2-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Jednotlivé body představují průměrnou hodnotu ze tří měření.

Parametry kalibrační přímky vypočtené metodou lineární regrese jsou uvedeny v tab. 5.

Na obr. 17 jsou uvedeny pro ilustraci DP voltamogramy studované látky pro koncentrační rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a na obr. 18 v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Z uvedených křivek vyplývá, že s rostoucí koncentrací CAP se zvyšují píky proudu I_p .

Z výsledků měření vyplývá, že kalibrační závislosti jsou za těchto podmínek lineární a potenciál nezávisí na koncentraci.

Nejnižší mez stanovitelnosti je $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.dm}^{-3}$.

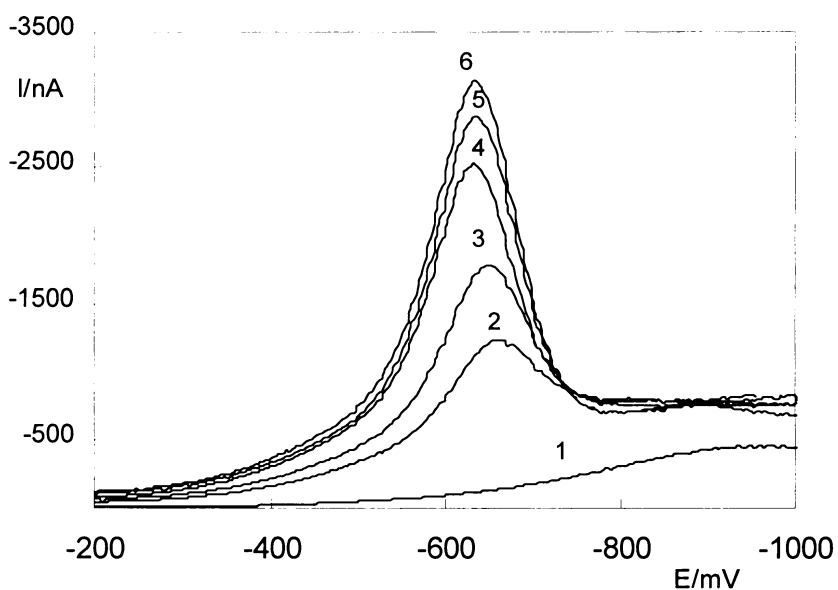


Obr. 16 Závislost proudu píku I_p měřeného na CPE technikou DPV v prostředí BR pufru o pH 7. Koncentrační rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 10 \cdot 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$.

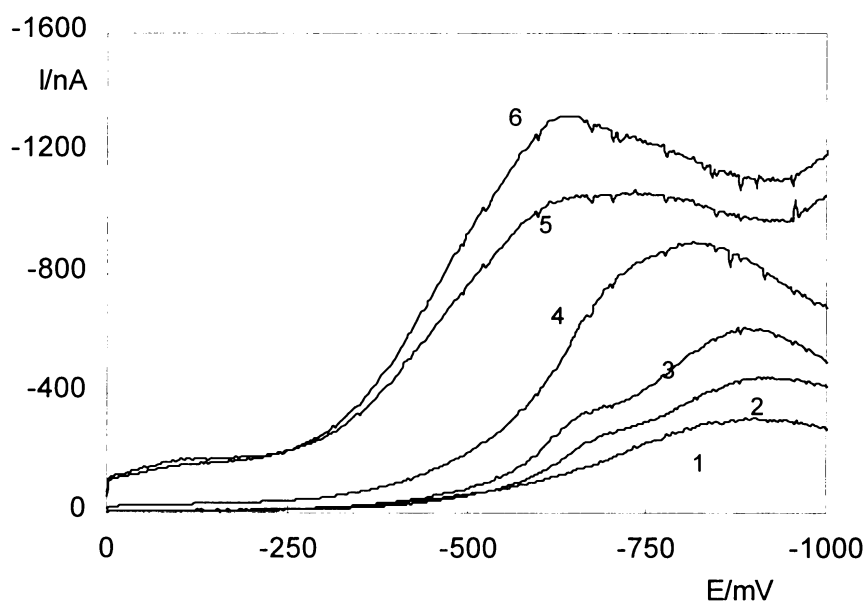
Tab.5

Parametry kalibrační přímky CAP měřené technikou DPV na CPE v prostředí BR pufru.

$c \text{ (mol.dm}^{-3}\text{)}$	směrnice ($\mu\text{A.mol}^{-1}\text{.dm}^3$)	úsek (μA)	Korel.koef.	$L_Q \text{ (mol.dm}^{-3}\text{)}$
$2 \cdot 10^{-6} - 10 \cdot 10^{-5}$	-0,2092	0,0243	0,9989	$2 \cdot 10^{-6}$



Obr. 17 DP voltamogramy CAP v prostředí BR pufru o pH 7 měřené na CPE. Koncentrace CAP ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$): 0 (1), $2\cdot 10^{-5}$ (1), $4\cdot 10^{-5}$ (2), $6\cdot 10^{-5}$ (3), $8\cdot 10^{-5}$ (4), $10\cdot 10^{-5}$ (5).



Obr. 18 DP voltamogramy CAP v prostředí BR pufru o pH 7 měřené na CPE. Koncentrace ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$): 0 (1), $2\cdot 10^{-6}$ (2), $4\cdot 10^{-6}$ (3), $6\cdot 10^{-6}$ (4), $8\cdot 10^{-6}$ (5), $10\cdot 10^{-6}$ (6).

4.3. Diferenční pulsní adsorpční rozpouštěcí voltametrie

Pro možnost dosažení nižší meze stanovitelnosti byl studován vliv doby akumulace na výšku píku (I_p) CAP o koncentraci $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Adsorpční rozpouštěcí analýza byla provedena metodou adsorpční rozpouštěcí voltametrie (AdSV) na CPE v prostředí BR pufru o pH 7.

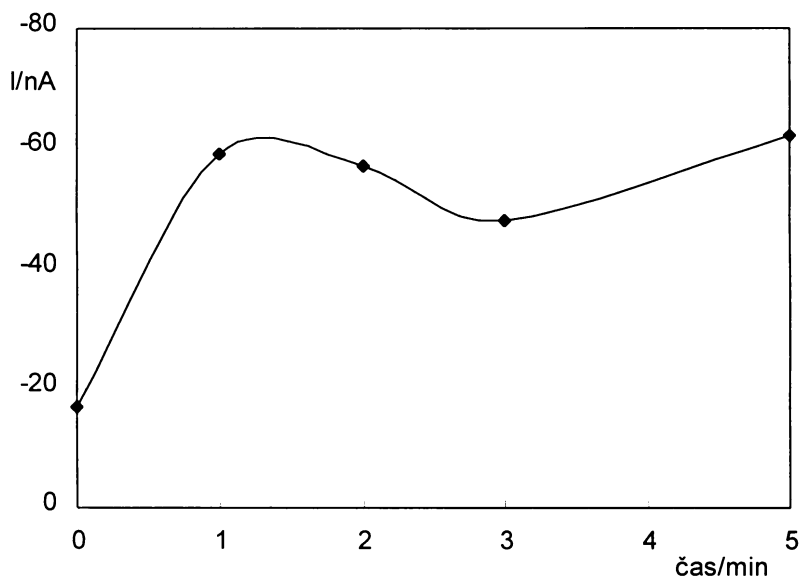
Jak je patrné z obr. 19 je nárůst proudu píku I_p při době akumulace 1 minuta znatelný. Tudiž AdSV lze využít ke zvýšení citlivosti metody stanovení.

Závislosti proudu píku (I_p) na koncentraci CAP byla proměřena technikou DPV na CPE v koncentračním rozmezí $4 \cdot 10^{-6}$ až $6 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru o pH 7.

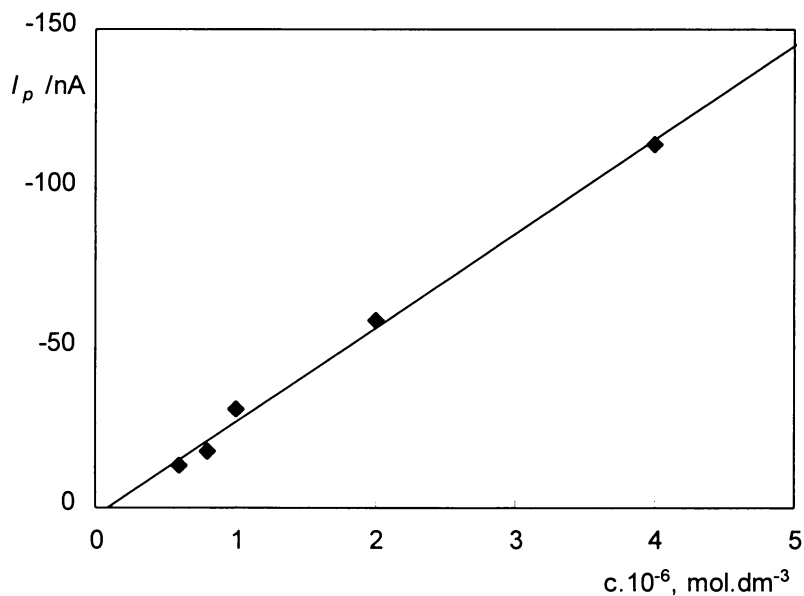
Kalibrační přímka CAP je uvedena na obr. 20 v koncentračním rozmezí $6 \cdot 10^{-7}$ – $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Jednotlivé body představují průměrnou hodnotu ze tří měření.

Parametry kalibrační přímky vypočtené metodou lineární regrese jsou uvedeny v tab. 6.

Z výsledků měření vyplývá, že kalibrační závislosti jsou za těchto podmínek lineární a potenciál nezávisí na koncentraci.



Obr. 19 Závislost proudu píku I_p na době akumulace CAP ($4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) v míchaném roztoku. Měřené technikou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 7.



Obr. 20 Závislost proudu píku (I_p) CAP měřeného na CPE technikou DPV. v prostředí BR pufru o pH 7 při akumulaci 1min. v míchaném roztoku. Koncentrační rozmezí $6 \cdot 10^{-7} - 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Tab. 6 Parametry kalibrační přímky CAP měřené technikou DPV na CPE v prostředí BR pufru.

c (mol.dm⁻³)	směrnice (nA.mol⁻¹.dm³)	úsek (nA)	Korel.koef.	L_Q (mol.dm⁻³)
6.10 ⁻⁷ – 4.10 ⁻⁶	-29,46	2,4970	0,9943	6.10 ⁻⁷

5. Závěr

- Byly vypracovány metody stanovení CAP:
 - technikou voltametrie s lineárním nárůstem potenciálu na uhlíkové pastové elektrodě v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ až $2 \cdot 10^{-6}$ mol.dm⁻³ v prostředí BR pufru pH 7, kde byla nalezena nejvyšší hodnota výšky píku (I_p).
 - technikou diferenční pulsní voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ až $2 \cdot 10^{-6}$ mol.dm⁻³ v prostředí BR pufru pH 7, kde byla nalezena nejvyšší hodnota výšky píku (I_p)
- Bylo prokázáno, že technika DC adsorpční rozpouštěcí voltametrie na CPE není využitelná pro zcitlivění stanovení chloramfenikolu, neboť látka se výrazně na pastu neakumuluje.
- Bylo prokázáno, že technika DP adsorpční rozpouštěcí voltametrie na CPE je využitelná pro DP voltametrické stanovení. Byla sledována doba akumulace a bylo zjištěno, že při akumulaci 1 minuta se zvýší proud píku CAP. Proto byla dále proměřena kalibrační závislost při akumulaci 1 min. Mez stanovitelnosti se snížila z $2 \cdot 10^{-6}$ mol.dm⁻³ na $6 \cdot 10^{-7}$ mol.dm⁻³.
- Závěrem lze říci, že metody DCV a DPV se neukázaly zcela vhodné pro stanovení CAP na uhlíkových pastových elektrodách. Přesto byly alespoň nalezeny nejvhodnější podmínky, za kterých lze CAP měřit a prokázalo se, že kyslík rozpuštěný v roztoku lze plně odstranit dostatečně dlouhým bubláním dusíkem.
- Lze říci, že jiné polarografické metody jsou pro stanovení CAP vhodnější.

6. Použitá literatura

- [1] Van der Lee, J. J.; Van Bennekom W. P.; De Jong H. J.: Determination of chloramphenicol at ultra-trace levels by high-performance differential pulse polarography. *Analytica chimica acta* 117, 171 –182 (1980).
- [2] Švancara, I.; Vytřas, K.; Barek, J.; Zima, J.: Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 31, 311-345 (2001).
- [3] *RxMed Health Care web site* [on-line]. Dostupné z URL: <<http://www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.prescribe.html>> [cit. 19.3.2005]
- [4] *Rodinná encyklopedie zdraví*. Prah, R. (ed.). Praha, Gemini 1993.
- [5] Van Ginkel, L. A.; Van Rossum H. J.; Zoontjes, P. W.; Van Blitterswijk H.; Ellen, G.; Van der Heeft, E.; De Jong, A. P. J. M.; Zomer, G.: Development and validation of a gas chromatographic-mass spectrometric procedure for the identification and quantification of residues of chloramphenicol. *Analytica Chimica Acta*, 237, 61-69 (1990).
- [6] IPCS Inchem: *Chemical safety information from intergovernmental organizations* [on-line]. Dostupné z URL: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v33je03.htm>> [cit. 20.3.2005]
- [7] Benestad, H. B.: *Drug mechanism in marrow aplasia* (1979). Dostupné z URL: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v23je02.htm>> [cit. 16.11.2005]
- [8] *Lékařské repetitorium*, svazek 1. A-L. Štork, A. (ed.). Praha, Avicenum 1981.
- [9] *Chloramfenicol CAS No. 56-75* [on-line] dostupné z URL: <<http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/eleventh/profiles/s032chlo.pdf>> [cit. 20.3.2005]
- [10] IPCS Inchem: *Chemical safety information from intergovernmental organizations* [on-line]. Dostupné z URL: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v23je02.htm>> [cit. 16.11.2005]
- [11] *Understanding animal research in medicine* [on-line]. Dostupné z URL: <<http://www.rds-online.org.uk>> [cit. 16.11.2005]

- [12] Kumana (1988). *Chemical safety information from intergovernmental organizations*. Dostupné z URL: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v33je03.htm>> [cit. 20.3.2005]
- [13] *Český lékopis*, 2.díl. Praha, Grada Publishing 1997.
- [14] Scortichini, G.; Annunziata, L.; Haouet, M. N.; Benedetti, F.; Krusteva, I.; Galarini, R.: ELISA qualitative screening of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria. *Analytica Chimica Acta* 535 (1-2), 43-48 (2005).
- [15] Rupp, H. S.; Stuart, J. S.; Hurlbut, J. A.: *LC/MS/MS Analysis of Chloramphenicol in Crab meat*. Dostupné z URL: <<http://www.cfsan.fda.gov/~frf/lib4302.html>> [cit. 16.11.2005]
- [16] Agui L, Guzman A, Yanez-Sedeno P, Pingarron J. M.: Voltammetric determination of chloramphenicol in milk at electrochemically activated carbon fibre microelectrodes. *Analytica Chimica Acta* 461 (1), 65-73 (2002).
- [17] Gaudin, V.; Cadieu, N.; Maris, P.: Inter-laboratory studies for the evaluation of ELISA kits for the detection of chloramphenicol residues in milk and muscle. *Food and agricultural immunology* 15 (3-4), 143-157 (2003).
- [18] Mena, M. L.; Agüí, L.; Martínez-Ruiz, P.; Yáñez-Sedeño, P.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M.: Molecularly imprinted polymers for on-line clean up and preconcentration of chloramphenicol prior to its voltammetric determination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376, 18–25 (2003).
- [19] Ortelli, D.; Edder, P.; Corvi, C.: Analysis of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography – Tandem mass spectrometry. *Chromatographia* 59 (1-2), 61-64 (2004).
- [20] Impens, S.; Reybroeck, W.; Vercammen, J.; Courtheyn, D.; Oghe, S.; De Wasch, K.; Smedts, W.; De Brabander, H.: Screening and confirmation of chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC-MS2 and LC-MS2. *Analytica Chimica Acta* 483 (1-2), 153-163 (2003).
- [21] Forti, A. F.; Campana, G.; Simonella, A.; Multari, M.; Scorichini, G.: Determination of chloramphenicol in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 529 (1-2), 257-263 (2005).

- [22] Fossdal K; Jacobsen E.: Polarographic determination of chloramphenicol. *Analytica Chimica Acta* 56(1), 105-115 (1971).
- [23] Hummert, C.; Luckas, B.: Determination of chloramphenicol in animal tissue using high-performance liquid chromatography with a column-switching system and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 668(1), 53-58 (1995).
- [24] Penney, L.; Smith, A.; Coates, B.; Wijewickreme, A.: Determination of chloramphenicol residues in milk, eggs, and tissues by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC international* 88 (2), 645-653 (2005).
- [25] Van Ginkel L. A.; Van Rossum H. J.; Zoontjes P. W.; Van Blitterswijk, H.; Ellen G.; Van der Heeft, E.; Dejong, A. P. J. M.; Zomer, G.: Development and validation of a gas-chromatographic mass-spectrometric procedure for the identification and quantification of residues of chloramphenicol. *Analytica Chimica Acta* 237 (1), 61-69 (1990).
- [26] Shen, H. Y.; Jiang H. L.: Screening, determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC-UVD, GC-ECD, GC-MS-EI-SIM and GCMS-NCI-SIM methods. *Analytica Chimica Acta* 535 (1-2), 33-41 (2005).
- [27] Jin, W.; Ye, X.; Yu, D.; Dong, Q.: Measurement of chloramphenicol by capillary zone electrophoresis following end-column amperometric detection at a carbon fiber micro-disk array electrode. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications* 741(2), 155-162 (2000).
- [28] Duda J., Kucharska, U.: Determination of chloramphenicol in food products by differential pulse polarography. *Analytical Letters* 32 (5), 1049-1064 (1999).
- [29] Zhao, M.; Hu, J.; Lai Y.; Li Q.; Wu Z.: Study of the voltammetric behavior of chloramphenicol and its determination at a Ni/C modified electrode. *Analytical Letters* 31 (2), 237-249 (1998).
- [30] Van der Lee, J. J.; Van der Lee-Rijsbergen, H. B. J.; Tjaden, U. R.; Van Bennekom, W. P.: A liquid chromatographic method for chloramphenicol and its nitro degradation products with reductive amperometric detection at a mercury electrode. *Analytica Chimica Acta* 149, 29-38 (1983).

- [31] Vytřas, K., Švancara, I.: Aplikace uhlíkových pastových elektrod v elektroanalýze. *Chemické Listy* 88, 412-422 (1994).
- [32] Švancara, I.; Vytřas, K.: Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod. *Chemické Listy* 88, 138-146 (1994).
- [33] Švancara, I.; Klemens, S.: Testing on unmodified carbon paste electrodes. *Chemické Listy* 93, 490-499 (1999).
- [34] Štulík K., Barek J.: *Elektrochemické analytické metody*. Praha, SPN 1985.
- [35] Švancara, I.; Vytřas, K.; Regner, F.; Smyth, M. R.: Application of carbon paste electrodes in highly methanolic solutions. *Electrochimica acta* 37, 1355-1361 (1992).