

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**STANOVENÍ AMBROXOLU
POMOCÍ UHLÍKOVÝCH
PASTOVÝCH ELEKTROD**

Diplomová práce

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

prof. RNDr. Jiří Zima, CSc.

Praha 2009

Marie Švecová

Tato bakalářská práce vznikla s finanční podporou MŠMT ČR (projekt MSM 0021620857 a LC 06035).

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele prof. RNDr. Jiřího Zimy, CSc. a konsultantky Mgr. Hany Dejmkové a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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 15.4.2009

.....
podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala školiteli prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc. a konsultantce Mgr. Haně Dejmkové za cenné rady, odborné vedení a pomoc při vypracování této diplomové práce.

Děkuji také své rodině a přátelům za důvěru, podporu a pomoc, kterou mi při práci poskytovali.

OBSAH

1. Teoretický úvod	7
1.1 Zaměření práce	7
1.2 Ambroxol a jeho farmaceutické využití	7
1.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti ambroxolu.....	10
1.4 Stanovení nečistot podle Českého lékopisu	12
1.5 Metody stanovení ambroxolu	13
1.6 Uhlíkové pastové elektrody	18
1.7 Iontové kapaliny (Room temperature ionic liquids)	22
2. Experimentální část	28
2.1 Použité chemikálie	28
2.2 Použitá aparatura	30
2.3 Další používaná zařízení	31
2.4 Pracovní postupy	31
2.4.1 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku ambroxolu ..	31
2.4.2 Voltametrické stanovení ambroxolu	33
2.4.3 Akumulace ambroxolu	33
2.5 Vývoj elektrod obsahujících RTIL (CILE, IL/CPE)	34
2.5.1 [EMIM][CF ₃ SO ₃]	34
2.5.2 [BMIM][PF ₆]	36
2.6 Stanovení ambroxolu v komerčních přípravcích	38
3. Výsledky a diskuze	39
3.1 Voltametrické stanovení ambroxolu	39
3.2 Kalibrační závislosti ambroxolu	42
3.3 Akumulace ambroxolu	46
3.4 Vývoj elektrod obsahujících RTIL (CILE, IL/CPE)	49
3.4.1 [EMIM][CF ₃ SO ₃]	49
3.4.2 [BMIM][PF ₆]	54
3.5 Stanovení ambroxolu v komerčních přípravcích	70
4. Závěr	73
5. Literatura	75

Seznam použitých zkratek a symbolů

<i>A</i>	absorbance
AC1V	voltametrie s 1. harmonickou střídavou složkou napětí (First Harmonic Alternating Current Voltammetry)
ASV	anodická rozpouštěcí voltametrie (Anodic Stripping Voltammetry)
[BMIM][PF ₆]	1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorofosfát
B-R pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
<i>c</i>	koncentrace
CILE	CPE obsahující RTIL jako pastovací kapalinu (Carbon Ionic Liquid Electrode)
CITP	kapilární izotachofóréza (Capillary Isotachopheresis)
CPE	uhlíková pastová elektroda (Carbon Paste Electrode)
IL/CPE	CPE modifikovaná iontovou kapalinou
CMCPE	chemicky modifikovaná uhlíková pastová elektroda (Chemically Modified Carbon Paste Electrode)
CV	cyklická voltametrie (Cyclic Voltammetry)
CZE	kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis)
DAD	detektor s diodovým polem (Diode Array Detector)
DCTV	stacionární voltametrie s technikou vzorkování proudu (Direct Current Tast Voltammetry)
DPV	diferenční pulzní voltametrie (Differential Pulse Voltammetry)
ε	dielektrická konstanta
[EMIM][CF ₃ SO ₃]	1-ethyl-3-methylimidazolium trifluormethansulfonát
FIA	průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis)
GCE	elektroda připravená ze skelného uhlíku (Glassy Carbon Electrode)
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GLC	rozpouštěcí plynová chromatografie (Gas Liquid Chromatography)

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
$L_{1,2}$	interval spolehlivosti
LIFD	laserem indukovaná fluorescenční detekce (Laser-Induced Fluorescence Detection)
LOD	mez detekce (Limit Of Detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (Limit Of Quantification)
LSV	voltametrie s lineárně proměnným potenciálem (Linear Sweep Voltammetry)
M_r	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MWCNTE	elektroda připravená z mnohostěnných uhlíkových nanotrubiček (Multi-Wall Carbon Nanotube Electrode)
PVC	polyvinyl chlorid
R	korelační koeficient
RTIL	iontová kapalina (Room Temperature Ionic Liquid)
s	směrodatná odchylka
SIA	sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis)
SIC	sekvenční injekční chromatografie (Sequential Injection Chromatography)
SKE	nasycená kalomelová elektroda
s_r	relativní směrodatná odchylka
SWV	voltametrie s pravoúhlým napěťovým pulzem (Square-Wave Voltammetry)
SWCNTE	elektroda připravená z jedностěnných uhlíkových nanotrubiček (Single-Wall Carbon Nanotube Electrode)
T_t	teplota tání
UV	ultrafialová oblast elektromagnetického záření
VIS	viditelná oblast elektromagnetického záření
V	objem
w	hmotnostní zlomek

1. Teoretický úvod

1.1 Zaměření práce

Předkládaná diplomová práce se zabývá studiem voltametrického chování ambroxolu, léčiva používaného k léčbě bronchopulmonálních onemocnění, metodou diferenční pulzní voltametrie a vývojem uhlíkových pastových elektrod modifikovaných iontovými kapalinami.

Cílem práce bylo nalezení podmínek pro voltametrické stanovení ambroxolu, s co nejnižší mezí detekce na klasické uhlíkové pastové elektrodě a na nových elektrodách obsahujících iontovou kapalinu s následným porovnáním získaných výsledků na obou typech elektrod.

1.2 Ambroxol a jeho farmaceutické využití

Ambroxol je léčivá látka přípravku Mucosolvanu, který je určen k mukolytické léčbě akutních a chronických bronchopulmonálních onemocnění provázených zvýšenou tvorbou vazkého průduškového hlenu, jeho ztíženým transportem a vykašláváním. Příkladem takových onemocnění jsou záněty horních a dolních cest dýchacích a infekční onemocnění dýchacích cest (akutní zánět průdušek, hrtanu, průdušnice). [1]

Farmakodynamické vlastnosti ambroxolu

Farmakoterapeutická skupina: Expektorancia, mukolytika.

Mechanismus účinku ambroxolu není zcela přesně znám, přesto byly v různých studiích odhaleny jeho mukolytické a expektoranční účinky. Při pokusech na zvířatech byl pozorován zvýšený podíl serózního bronchiálního sekretu. Dále zvyšuje tvorbu plicního surfaktantu (látka pokrývající vnitřní stěny plicních sklípků) a aktivuje vykašlávání a zlepšení vylučování hlenu (mukociliární clearance) zmenšením jeho viskozity a aktivací řasinkového epitelu. Zvýšení mukociliární clearance a hlenové sekrece usnadňuje vykašlávání hlenu a zmírňuje kašel.

Farmakologické nálezy odpovídají pozorováním v klinických studiích při léčbě symptomů horních cest dýchacích ambroxolem. Po podání inhalací

dochází k rychlé úlevě od bolesti a s ní spojených obtíží, navíc v posledních klinických studiích bylo prokázáno, že pastilky s obsahem ambroxolu značně ulevují při akutních bolestech v krku. [1]

Farmakokinetické vlastnosti ambroxolu

Ambroxol se po perorálním podání u člověka rychle a téměř úplně absorbuje. T_{max} činí po perorálním podání 1-3 hodiny. U tobolek s prodlouženým uvolňováním byla zjištěna relativní dostupnost 95 % ve srovnání s tabletami 30 mg. Vazba na plazmatické bílkoviny činí 80 – 90 %. Ambroxol je po perorálním, nitrožilním nebo nitrosvalovém podání rychle a dobře distribuován z krve do tkání, nejvyšší koncentrace je pak v plicní tkáni.

Ambroxol je v převážné většině metabolizován játry. Přibližně 30 % perorálně podané dávky je eliminováno během prvního průchodu játry (first pass effect). Vylučování probíhá z 90 % ledvinami, kde vylučované metabolity jsou především dibromanthranilová kyselina a glukuroidy, vznikající v játrech. Méně než 10 % ledvinami vyloučeného množství připadá na nezměněný ambroxol. Při těžkých jaterních onemocněních se clearance ambroxolu snižuje o 20 – 40 %. Při těžké poruše ledvin je eliminační poločas metabolitů ambroxolu prodloužen. Nebylo zjištěno, že by pohlaví nebo věk ovlivňovaly farmakokinetiku ambroxolu ve významné míře. [1]

Bezpečnost přípravku

Ambroxol má velmi nízký index akutní toxicity. Při studiích perorální chronické toxicity u potkanů (52 a 78 týdnů), králíků (26 týdnů) a psů (52 týdnů) nebyl zjištěn žádný cílový orgán z hlediska toxicity. Hodnota NOAEL (hladina, při níž ještě nebyly zjištěny nežádoucí účinky) byla 50 mg/kg (potkan), 40 mg/kg (králík) a 10 mg/kg (pes).

Ve čtyřtýdenních studiích intravenózní toxicity, v nichž byl použit ambroxol u potkanů v dávce 4, 14 a 64 mg/kg a u psů v dávce 45, 90 a 120 mg/kg (3 infuze), se neprojevila žádná závažná lokální systémová toxicita včetně histopatologie. Všechny nežádoucí účinky byly reverzibilní.

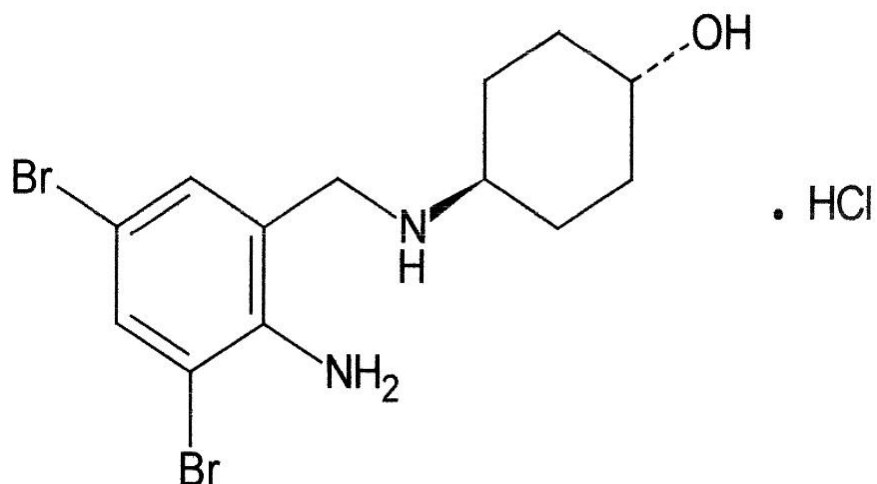
Ambroxol prochází placentární bariérou, ale studie na zvířatech nenasvědčují přímým nebo nepřímým škodlivým účinkům, pokud se týká těhotenství, vývoje embrya a plodu, porodu nebo postnatálního vývoje. Nebyly zjištěny žádné teratogenní účinky při perorálních dávkách až 3000 mg/kg u potkanů a 200 mg/kg u králíků. Fertilita samců a samic potkana nebyla poškozena až do dávky 500 mg/kg.

Hodnota NOAEL (hladina, při níž ještě nebyly zjištěny nežádoucí účinky) byla ve studii peri- a postnatálního vývoje stanovena na 50 mg/kg. Střední dávka 500 mg/kg byla mírně toxická pro feny a štěňata, což se projevilo zpomalením hmotnostních přírůstků a snížením počtu mláďat ve vrhu.

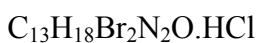
Ambroxol nebyl mutagenní (Amesův test a mikronukleární test). Léčivá látka přípravku nevykázala tumorogenní vlastnosti ve studiích karcinogenity uskutečněných na myších (50, 200 a 800 mg/kg) po dobu 105 týdnů a na potkanech (65, 250 a 1000 mg/kg) po dobu 116 týdnů. [1]

1.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti ambroxolu

Strukturní vzorec studované látky



Sumární vzorec studované látky



C.A.S. Registry number

18683-91-5

C.A.S. Name

2-Amino-3,5-dibromo-N-(trans-4-hydroxycyclohexyl)benzylamine

Chemický název

trans-4-[(2-amino-3,5-dibrombenzyl)amino]cyklohexanol hydrochlorid

Obsah jednotlivých prvků

C-37,66 %; H-4,62 %; Br-38,55 %; N-6,76 %; O-3,86 %; Cl-8,55 %

Relativní molekulová hmotnost

$M_r = 414,57$

Fyzikální stav

Bílý nebo nažloutlý krystalický prášek bez zápachu. [3]

Teplota tání

$T_t = 235 - 240 \text{ } ^\circ\text{C}$ [3]

Rozpustnost

Látka je mírně rozpustná v destilované vodě a ethanolu, nerozpustná v chloroformu, benzenu, dichlormethanu a dobře se rozpouští v dimethylformamidu a methanolu. [3]

Skladování

Skladovací teplota 2-8 °C v temnu. [3]

1.4 Stanovení nečistot podle Českého lékopisu

Zkoušky na čistotu se podle předpisu Českého lékopisu provádí metodou kapalinové chromatografie na koloně délky 25 cm s vnitřním průměrem 4 mm. Stacionární fáze je oktadecylsilanizovaný silikagel pro reversní chromatografii s velikostí částic 5 μm .

Mobilní fáze je směs stejných objemových dílů acetonitrilu a pufru (hydrogenfosforečnan amonný rozpuštěný ve vodě o $\text{pH} = 7$ upravený pomocí kyseliny fosforečné). Průtoková rychlost 1 ml/min a nástřik vzorku 20 μl .

Detekce je realizována spektrofotometrickým detektorem při vlnové délce 248 nm. [2]

1.5 Metody stanovení ambroxolu

Pro stanovení ambroxolu byla použita řada analytických metod k nejrůznějším aplikacím, ať už se jednalo o rutinní stanovení obsahu ambroxolu v komerčních přípravcích, či stanovení obsahu ambroxolu v biologických vzorcích. Mezi nejpoužívanější metody lze zařadit metody průtokové analýzy a metody vsádkové.

Voltametrické chování ambroxolu bylo dosud studováno jen v několika publikovaných pracích. *Demircigil a kol.* [4] zkoumali oxidačně-redukční chování ambroxolu na elektrodě ze skelného uhlíku metodami diferenční pulzní voltametrie, cyklické voltametrie a voltametrie s lineárně proměnným potenciálem (LSV). Dále byl studován vliv pH na výšku píku ambroxolu metodou diferenční pulzní voltametrie. Metodou cyklické voltametrie byl studován mechanismus reakce probíhající na elektrodě. Za optimálních podmínek byl stanoven obsah ambroxolu v komerčních přípravcích. *Habib a Zayed* [5] studovali redukci ambroxolu metodou adsorpční rozpouštěcí voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě při různých modech rozpouštění adsorbované látky z elektrody, např. stacionární voltametrie s technikou vzorkování proudu (DCTV), diferenční pulzní voltametrie (DPV), voltametrie s pravoúhlým napětřovým plusem (SWV) a voltametrie s první harmonickou střídavou složkou napětí (AC1V). Sledování odezvy adsorpčního katodického rozpouštění bylo studováno při různých experimentálních podmínkách, např. změny základního elektrolytu, pH, doby akumulace, amplitudy pulzu, rychlosti polarizace elektrody atd. Akumulace ambroxolu o koncentraci 2 µg/ml byla prováděna v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru v rozmezí pH = 8 až 11 po dobu 30 s, potenciálu akumulace od -200 mV do -1000 mV, amplitudy pulsu od 10 mV do 100 mV a rychlosti polarizace elektrody 40 mV/s. Metodou standardního přídávku s použitím voltametrie s pravoúhlým napětřovým pulzem byl stanoven obsah ambroxolu v komerčních přípravcích. *Jin a kol.* [6] provedli anodickou voltametrii ambroxolu na CPE v prostředí 0,5 mol/l kyseliny sírové.

Nejvíce vyvinutými metodami pro stanovení ambroxolu jsou metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie a kapalinové chromatografie s využitím hmotnostní detekce. *Bazylak a kol.* [7] prováděli studium

chromatografického chování ambroxolu a bromhexinu na pevných elektrodách s membránami, kde základní kapalnou matricí je PVC membrána obsahující tři typy kationtových komponent. Membrána byla uchycena na platinové elektrodě nebo na elektrodě ze skelného uhlíku. Detekce byla prováděna potenciometricky s detektorem typu wall-jet umístěném na výstupu z HPLC systému. Samotné stanovení bylo provedeno pomocí různých typů kapalinové chromatografie. Použitá mobilní fáze vhodná pro ideální eluci sledované látky měla specifické složení dle typu použité HPLC. Pro každý typ HPLC byla stanovena mez detekce. Na elektrodách poskytujících nejnižší meze detekce a dobrou separaci analytů vedle sebe byl stanoven obsah ambroxolu v komerčních přípravcích. *Dincer a kol.* [8] vyvinuli metodu derivační UV spektrometrie pro stanovení ambroxolu a porovnali získané výsledky s HPLC stanovením. Následně byl také stanoven obsah ambroxolu v komerčních přípravcích. *Heinänen a kol.* [9] vyvinuli a validovali metodu HPLC separace ambroxolu a kyseliny benzoové. Metoda je vhodná pro stanovení obsahu ambroxolu v komerčních přípravcích, hlavně v sirupech, a ke sledování stability a degradačních podmínek pro standardy a komerční přípravky.

Indrayanto a kol. [10] vyvinuli jednoduché a rychlé metody pro rutinní stanovení ambroxolu hlavně v tabletách. Použity byly metody HPLC, GLC a UV spektrofotometrie.

Koundourellis a kol. [11] vyvinuli HPLC metodu stanovení ambroxolu v přítomnosti konzervačních látek obvykle se vyskytujících v sirupech. *Qi a kol.* [12] vyvinuli metodu kapalinové chromatografie a dosáhli současného stanovení ambroxolu a roxithromycinu v nové tabletě. Studium chromatografické separace ambroxolu a roxithromycinu pro kontrolu kvality tablet. *Zarzuelo a kol.* [13] vyvinuli a validovali HPLC metodu s UV detekcí pro stanovení ambroxolu a jeho detekci v komerčních přípravcích.

Kim a kol. [14] využili spojení HPLC s tandemovou hmotnostní spektrometrií pro stanovení ambroxolu v plasmě. Následná validace metody prokázala, že metoda je mnohem rychlejší než podobná stanovení jen pomocí HPLC nebo GC, kde je nutná příprava vzorku a poměrně značně velké objemy vzorků pro stanovení. Metoda je vhodná pro stanovení ambroxolu ve vzorcích

tělních tekutin (krevní plasma, moč ap.). *Su a kol.* [15] také využili spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií s ionizací pomocí elektrospreje pro stanovení ambroxolu v krevní plazmě. Zjednodušili extrakci ambroxolu ze vzorku krevní plazmy oproti předchozímu autorovi, ale nedosáhli tak nízké meze detekce.

Metody průtokové analýzy FIA a metody průtokové analýzy spojené s chromatografickou kolonou využívanou pro HPLC, SIC jsou další z metod využitých ke stanovení ambroxolu. *Abdel-Ghani a kol.* [16] využili potenciometrické detekce na iontově selektivní elektrodě se zabudovaným iontem ambroxolu do PVC membrány. Využili jak vsádkových podmínek měření, tak průtokové metody FIA. Oběma metodami byly stanoveny obsahy ambroxolu v komerčních přípravcích. Metoda je rychlejší, méně náročná na přípravu vzorku a instrumentaci v porovnání s ostatními metodami stanovení ambroxolu, jako např. HPLC, spektrofotometrie nebo CZE. *Benli a kol.* [17] využili průtokové analýzy, FIA. Byly zjišťovány optimální podmínky stanovení, a to pH, injektovaný objem vzorku a typ rozpouštědla. Vyvinutá metoda byla porovnána s UV-spektrometrií. Byl stanoven obsah ambroxolu v komerčních tabletách.

Šatínský a kol. [18] využili techniky SIA, ke které zařadili monolitickou kolonu, tím dosáhli možnosti separace ambroxolu od doxycyklinu a ostatních složek obsažených v komerčních přípravcích, hlavně v kapslích, a také kvantitativního stanovení ambroxolu. Metoda byla validována. Proti HPLC je nespornou výhodou krátká doba analýzy a nižší spotřeba činidel, a tím i nižší cena jedné analýzy. *Šatínský a kol.* [19] v této práci využili stejné techniky jako v předchozím případě, tedy SIA s monolitickou kolonou. Vyvinuli a validovali metodu ke stanovení ambroxolu v komerčních přípravcích v přítomnosti několika konzervačních látek, které se v přípravcích běžně vyskytují.

CZE a CITP, metody založené na separaci molekul s nábojem (iontů), které se liší molekulovou hmotností, tvarem a nábojem, byly také použity v několika publikovaných pracích. *Pérez-Ruiz a kol.* [20] využili kapilární zónové elektroforézy k separaci bromhexinu a ambroxolu a jejich stanovení v komerčních přípravcích, v krevním séru a moči. Následně spojili detektor s diodovým polem s CZE, která umožnila velmi rychlou identifikaci analytů ve

vzorcích. V práci [21] stejná skupina autorů využila metody CZE, ale tentokrát s laserem indukovanou fluorescenční detekcí, tzv. LIFD a provedli derivatizaci molekuly ambroxolu fluorescein-izokyanátem, který poskytuje pík modré čáry argon iontového laseru. Metodou byl stanoven ambroxol v tělních tekutinách (krevní sérum a moč) a v komerčních přípravcích. V práci *Pospíšilová a kol.* [22] autoři zjistili, že k separaci ambroxolu a bromhexinu nelze využít izotachofórezu, což ale podle názoru autorů ani není z farmaceutického hlediska potřebné vzhledem k podobným účinkům obou látek. Proto byly obě látky stanoveny odděleně a následně byl stanoven i jejich obsah v řadě komerčních přípravků. Další nevýhodou metody je, že ji nelze použít ke stanovení nízkých obsahů ambroxolu a bromhexinu v tělních tekutinách.

Metody Ramanovy spektrometrie jsou nedestruktivními variantami stanovení ambroxolu. *Hwang a kol.* [23] využili Ramanovy spektrometrie k nedestruktivnímu stanovení obsahu ambroxolu v tabletách. Metoda byla nejdříve vyvinuta pro laboratorně připravené tablety s proměnným obsahem ambroxolu, pro které byla změřena Ramanova spektra. Metoda byla dále použita ke stanovení obsahu ambroxolu v komerčních tabletách. *Szostak a kol.* [24] využili FT-Ramanovy spektrometrie ke stanovení obsahu ambroxolu v komerčních tabletách s nízkým obsahem analyzované složky. K vyhodnocení spekter využili chemometrického modelu a modelu vnitřního standardu.

Tab. 1.5.1 Meze detekce a meze stanovitelnosti jednotlivých metod využitých ke stanovení ambroxolu.

METODA	metoda/detekce	LOD [mol/l]	LOQ [mol/l]	[Literatura]
Voltametrie	DPV	$9,4 \cdot 10^{-7}$	$3,2 \cdot 10^{-6}$	[4]
	DCTV	$2,5 \cdot 10^{-6}$	–	
	DPV	$1,2 \cdot 10^{-6}$	–	[5]
	SWV	$7,1 \cdot 10^{-7}$	–	
	AC1V	$8,7 \cdot 10^{-7}$	–	
	ASV	$3,0 \cdot 10^{-8}$	–	[6]
HPLC	potenciometrická	$2,1 \cdot 10^{-9}$	–	[7]
	UV–VIS	$4,3 \cdot 10^{-7}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	[10]
	UV–VIS	–	$1,4 \cdot 10^{-6}$	[12]
	UV–VIS	–	–	[8, 9, 11, 13]
LC-MS/MS	MS	–	$4,8 \cdot 10^{-10}$	[14]
HPLC-MS/ESI	MS	–	$2,4 \cdot 10^{-9}$	[15]
GC	FID	$4,9 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$	[10]
UV spektrometrie	UV–VIS	$1,9 \cdot 10^{-7}$	$6,3 \cdot 10^{-7}$	[10]
FIA	potenciometrická	–	–	[16]
	UV–VIS	–	–	[17]
SIC	UV–VIS/DAD.	$1,2 \cdot 10^{-6}$	$4,1 \cdot 10^{-6}$	[18]
	UV–VIS/DAD.	$2,4 \cdot 10^{-6}$	$8,0 \cdot 10^{-6}$	[19]
CZE	UV–VIS/DAD	až $2,6 \cdot 10^{-8}$	–	[20]
	LIFD	až $1,0 \cdot 10^{-9}$	–	[21]
CITP	vodivostní	–	–	[22]

1.6 Uhlíkové pastové elektrody

Uhlíkové pastové elektrody (Carbon Paste Electrodes, CPEs) jsou běžně používané v moderních elektroanalytických metodách ke stanovení jak organických, tak anorganických analytů. Mez stanovitelnosti pomocí nemodifikovaných CPEs je běžně $1.10^{-6} - 1.10^{-7}$ mol/l. U přímých stanovení s akumulací analytu pak lze dosáhnout $LOD \approx 1.10^{-8}$ mol/l i nižší. Zavedení modifikovaných elektrod pak dále vedlo ke snížení mezí stanovitelnosti. [25]

Historie

Uhlíkové pastové elektrody byly objeveny v roce 1958 R. N. Adamsem. Objev uhlíkových pastových elektrod je spojen s polarografií Jaroslava Heyrovského a vynálezem kapající rtuťové elektrody. Původní myšlenkou autora byla snaha vynalézt tzv. „uhlíkovou kapající elektrodu“, jejíž konstrukce byla podobná jako u kapající rtuťové elektrody. Metoda měla být využitelná pro anodické oxidace organických sloučenin. Materiál pro snímání byl tvořen směsí uhlíkového prášku s neelektroaktivní kapalinou jako pojivem. Byl nazván „uhlíkovou pastou“. Problém nastal při praktických experimentech, které neodpovídaly teoretickým předpokladům, avšak tzv. „uhlíková pasta“ se jevila jako vhodný elektrodový materiál.

V prvních letech výzkumu byly prostudovány základní charakteristiky uhlíkových past a jejich použití. V 60. letech byla snaha o první modifikace uhlíkových past a jejich snadnější přípravu. To vše vedlo ke změnám vlastností uhlíkových past přidáním dalších komponent. V 70. letech byla připravena uhlíková pastová elektroda s elektrolytickým pojivem. Modifikace uhlíkových past připravovaných disperzí uhlíkových částic v alkoholovém roztoku dimethylglyoximu byla jedním z milníků historie CPEs. V dalších letech následoval obrovský vývoj různých chemických modifikací uhlíkových pastových elektrod (CMCPEs). [25]

Klasifikace uhlíkových pastových elektrod

Uhlíkové pastové elektrody jsou typem tuhých elektrod, které obsahují jak vodivou složku (uhlík), tak složku izolační (pastová kapalina). Tyto směsi jsou označovány jako tzv. *nemodifikované uhlíkové pasty*. Ve snaze nalézt lepší vlastnosti uhlíkových past došlo k určitým změnám v jejich složení a byly vyvinuty tzv. modifikované uhlíkové pasty.

Modifikované uhlíkové pasty jsou obvykle směsi uhlíkových prášků, neelektroaktivního pojiva a složkou navíc je tzv. modifikátor. Modifikátor může být jednosložkový nebo i vícesložkový. Množství modifikátoru v uhlíkové pastě se pohybuje mezi 10 – 30 %, v závislosti na charakteru modifikátoru a schopnosti vytvářet dostatek aktivních míst v uhlíkové pastě. Hlavním účelem modifikace elektrod je získání nových senzorů s předdefinovanými vlastnostmi. K modifikaci elektrod může docházet různými způsoby. Jednou z možností je přimísení modifikujících komponentů do pasty, kdy dochází k modifikaci celého objemu pasty. Tyto elektrody se používají jako selektivní čidla pro danou látku nebo ion. Dále lze provést alteraci (tj. změnu fyzikálně-chemických vlastností) nebo modifikaci *in situ*, kde dochází k modifikaci pouze povrchu uhlíkové pasty. Takto upravený povrch může být po analýze odstraněn a „čistý“ povrch lze použít jako nemodifikovaný znovu. [25]

Konstrukce a příprava

Uhlíkové pasty jsou připravovány jako směsi uhlíkového prášku a organického rozpouštědla s neelektrolytickým charakterem. Nejvhodnější jsou uhlíkové prášky s vysokou uniformitou částic, které mají předběžně upravený povrch se zanedbatelnou adsorpční schopností. K přípravě uhlíkové pasty se nedoporučuje používat saze, aktivní uhlí, apod. z toho důvodu, že u těchto materiálů se obtížně definuje velikost částic, jejich distribuce a mají značné adsorpční schopnosti. Tyto vlastnosti by vedly k nežádoucímu chování past. Správně připravené pasty jsou stabilní a vydrží řadu týdnů. Jako pastové kapaliny se nejčastěji používají lehké uhlovodíky $C_6 - C_{10}$, aromáty, silikonové nebo parafínové oleje (Nujol). Tyto nepolární pastové kapaliny splňují veškerá kritéria: jsou dostatečně chemicky inertní, elektrochemicky inaktivní, málo

těkavé, nemísitelné s vodou a tvoří pastové směsi s požadovanou konzistencí. Nevýhodou past vyráběných z těchto olejů je určitá náchylnost k degradaci v prostředí organických rozpouštědel. [25]

Uhlíkové pasty musí být umístěny do vhodných elektrodoých těl, jejichž stavba závisí na typu elektrody nebo na charakteru měření. Používají se např. různé typy skel, PVC tuby, teflonové tyčinky, které mohou být na konci plněny novou uhlíkovou pastou. Po naplnění těla elektrody čerstvou pastou by se měla nechat v klidu „vyzrát“ alespoň 24 hodin, aby došlo k ustálení jejich vlastností díky samovolné homogenizaci směsi. Elektrodoová těla mají jednoduché konstrukční uspořádání, které je vybaveno pístem na vytlačení elektrodoové pasty. Pro běžné CPEs jsou průměry koncových otvorů vytvářejících pracovní povrch uhlíkové pasty 2 – 10 mm. Tyto průměry jsou vhodné pro většinu elektrochemických měření. Toto uspořádání umožňuje prakticky okamžitou obnovu aktivního povrchu uhlíkové pasty, kterého je dosahováno otíráním uhlíkové pasty vlhkým filtračním papírem. [25, 26]

Vlastnosti uhlíkových past

Uhlíkové pasty mají využitelný potenciálový rozsah ve většině elektrolytů $-1,5$ V až $+1,0$ V vs. SKE podle pH prostředí. Limit v anodické oblasti je způsoben oxidací základního elektrolytu a katodický potenciálový limit je dán hodnotou přepětí elektrody vůči vodíku. Katodický i anodický potenciálový limit lze ovlivnit úpravou uhlíkového prášku nebo typem použité pastové kapaliny. Výhodou CPEs jsou velmi nízké zbytkové proudy (proudy v roztoku čistého základního elektrolytu). Reakce, které na CPEs probíhají, mají specifickou reakční kinetiku. Z fyzikálně-chemických vlastností jsou významné hlavně heterogenita elektrod (složený charakter), lipofilita, vysoká vodivost a nízký ohmický odpor. Nevýhodou jsou efekty stárnutí elektrody a tedy jejich omezená životnost. [25]

Analytické aplikace a příklady využití

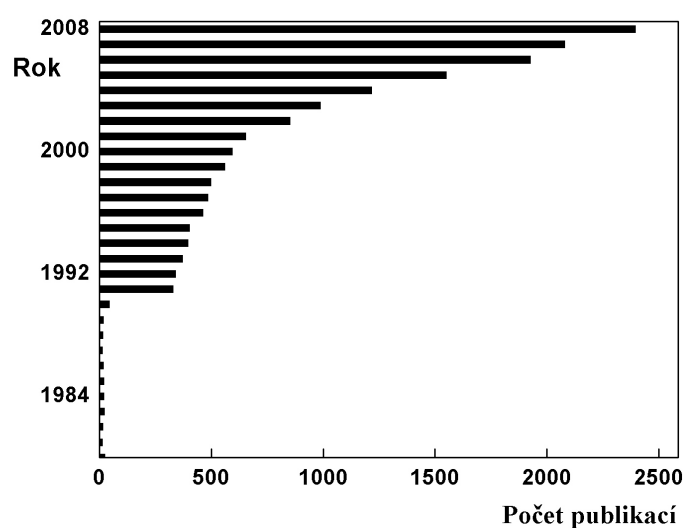
Pomocí uhlíkových pastových elektrod lze stanovit jak anorganické látky, tak látky organické. Možností využití CPEs v analytické chemii je celá řada, jak v množství využitelných metod, tak v množství látek, které lze pomocí těchto elektrod stanovit. Mezi nejpoužívanější metody patří voltametrie, výzkum reakčních mechanismů a elektrochemického chování anorganických a organických látek. Z nichž nejčastěji studované jsou například ionty těžkých kovů a anorganických molekul (NO_x , SO_2 , H_2S), organické polutanty a jejich distribuce v životním prostředí, analýza léčiv a jejich metabolitů, omamných látek a biologicky významných sloučenin. Další analytické metody jako například ampérometrie, potenciometrie, coulometrie a metody průtokové analýzy, HPLC a FIA jsou využívány ke studiu chování obdobných typů látek jako u voltametrie. [25, 27]

1.7 Iontové kapaliny (Room temperature ionic liquids)

RTILy (room temperature ionic liquids) jsou organické soli, které jsou kapalné za laboratorní teploty. RTILy jsou netěkavá, nehořlavá, teplotně stálá rozpouštědla s vysokou hustotou a iontovou vodivostí, nenáročná na výrobu. Vyskytují se v mnoha druzích a je možné je připravit podle potřeb, tzn. lze zkombinovat požadovaný anion s kationem. [28, 29]

Historie

Již v roce 1914 byl popsán první RTIL ethylamonium nitrát $[\text{C}_2\text{H}_5\text{NH}_3][\text{NO}_3]$ s teplotou tání $12\text{ }^\circ\text{C}$, RTILy tedy nejsou žádnou novinkou. V roce 1980 se RTILy začaly používat jako nevodná polární rozpouštědla pro elektrochemické a spektroskopické studie komplexů přechodných kovů. Hlavní zájem o RTILy nastal v roce 1994. Od té doby došlo k velkému rozmachu RTILů ve všech odvětvích chemie, což je vidět i z počtu publikovaných prací, který vzrostl exponenciálně, viz obr. 1.5.1. [30, 31, 32]



Obr. 1.7.1 Počet publikací obsahujících frázi „ionic liquid“ v názvu, abstraktu nebo jako klíčové slovo. [31]

Rozdělení:

Nejčastěji se vyskytující RTILy jsou podle aniontu, který obsahují, rozdělovány do tří skupin:

- 1.) systémy založené na AlCl_3 a organických solích typu 1-butylpyridinium chlorid [BPCl], 1-alkyl-3-methylimidazolium chlorid [C_nMIM]Cl a jejich deriváty
- 2.) systémy založené na organických kationtech stejných jako v první skupině a aniontech jako, např. $[\text{BF}_4]^-$, $[\text{PF}_6]^-$, $[\text{SbF}_6]^-$ a další
- 3.) systémy založené na výše uvedených organických kationtech s anionty typu $[\text{CF}_3\text{SO}_3]^-$, $[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]^-$ a jim podobné. [31]

Vlastnosti RTILů

RTILy jsou složeny z relativně velkých asymetrických organických kationtů, které obsahují dusík nebo fosfor (např. alkylypyridiniové kationty, alkyylimidazoliové kationty, alkylypyrolidiniové kationty, alkylyfosfoniové kationty) a velkých anorganických nebo organických aniontů, např. halogenidy Cl^- , Br^- , I^- , hexafluorofosfát $[\text{PF}_6]^-$, tetrafluoroborát $[\text{BF}_4]^-$, nitrát $[\text{NO}_3]^-$, trifluormethansulfonát $[\text{CF}_3\text{SO}_3]^-$, bis(trifluormethylsulfonyl)imid $[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]^-$ a ionty založené na fluorovaných amidech. Nejčastěji se vyskytující alkylové řetězce jsou ethyl, butyl, hexyl, oktyl a decyl. [33, 31]

Asymetrický kation je zodpovědný za nízkou hodnotu mřížkové energie a tím i kapalný stav RTILů za laboratorní teploty. [30]

Díky své netěkavosti, nehořlavosti, teplotní stabilitě a ve většině případů i nižší toxicitě nahrazují klasická těkavá organická rozpouštědla a používají se jako rozpouštědla jak pro organické, tak pro anorganické látky, jako tzv. zelená rozpouštědla „green solvents“. Jejich „enviromentálnost“ je diskutabilní, protože řada RTILů obsahuje fluorované anionty. Je ale pravděpodobné, že tyto RTILy jsou méně toxické než jejich ionty. Dále jsou velmi dobře vodivé, mají vysokou iontovou pohyblivost, široké potenciálové okno a výbornou chemickou i teplotní stálost. Vysoká iontová vodivost je závislá mimo jiné na viskozitě a velikosti aniontu. [28, 30, 33, 34]

Fyzikálně chemické vlastnosti RTILů závisí na povaze a velikosti kationtu a aniontu a je velmi složité dávat je do souvislosti s jejich chemickou strukturou. Změna vlastností je patrná již se změnou polohy substituentu.

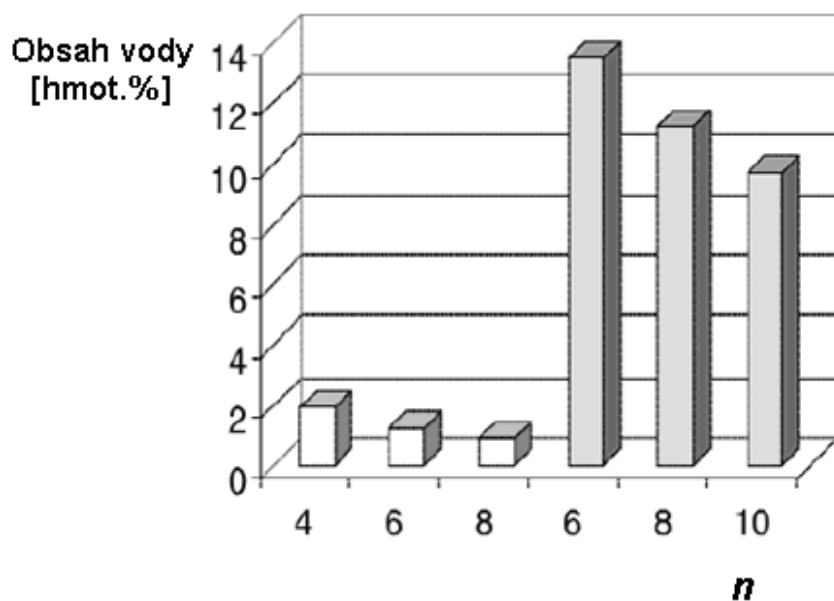
Rozpustnost RTILů v organických rozpouštědlech závisí na dielektrické konstantě (ϵ) rozpouštědla. Řada RTILů je plně mísitelná s rozpouštědly s dielektrickou konstantou větší než 6. [30]

Rozpustnost RTILů ve vodě je velmi závislá na povaze aniontu, na povaze kationtu závisí až sekundárně. RTILy obsahující halogenidy, ethanoáty, nitráty nebo trifluoracetáty jsou rozpustné ve vodě. RTILy obsahující hexafluorofosfát a bis(triflát)amid vytvářejí s vodou dvě fáze. Bylo zjištěno, že rozpustnost ve vodě klesá s rostoucí délkou postranního řetězce kationtu, tedy od butylu přes hexyl k oktylu, viz obr. 1.7.2. Hydrofobicita aniontů roste v pořadí: Cl^- , I^- , BF_4^- , PF_6^- , $(\text{Tf}_2\text{N})^-$. Ve vodě jsou tedy méně rozpustné RTILy obsahující PF_6^- než RTILy obsahující BF_4^- .

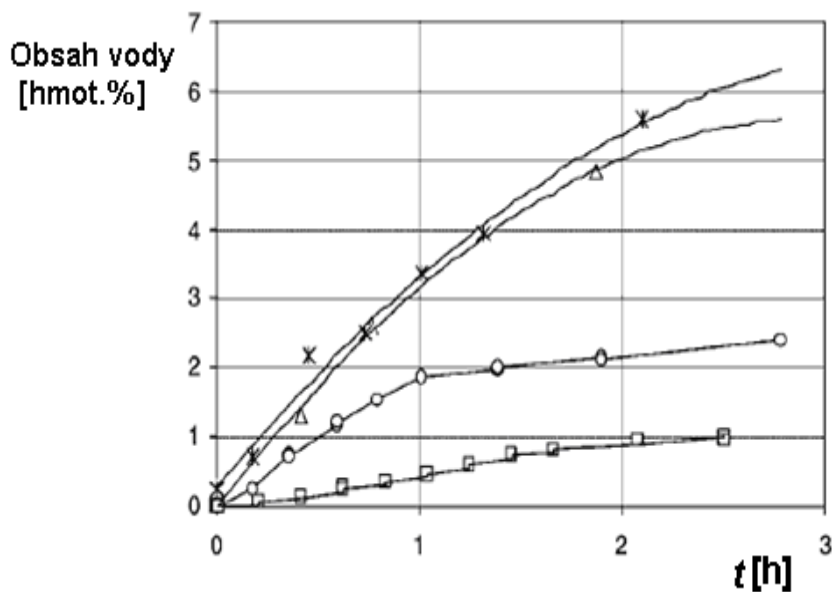
Ve skutečnosti jsou i tzv. hydrofobní RTILy hygroskopické. Byla studována hygroskopicitá několika typů RTILů: $[\text{C}_8\text{MIM}]\text{Cl}$, $[\text{C}_8\text{MIM}][\text{NO}_3]$, $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{BF}_4]$, $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$. U uvedených RTILů byla měřena absorpce vzdušné vlhkosti za laboratorní teploty v závislosti na čase (viz obr. 1.7.3). Z grafu vyplývá, že RTILy obsahující chlorid a nitrát absorbují mnohem větší množství vody než zbylé dva RTILy, ale i hexafluorofosfát absorbuje vodu v cca 1% své hmotnosti za 2,5 hodiny, což je třeba mít na paměti, pokud hodláme pracovat s látkami, které jsou citlivé na vlhkost. [28, 29, 32, 33, 35]

RTILy se vyznačují vysokou viskozitou, která je závislá na struktuře kationtu, délce a rozvětvenosti alkylového řetězce. Jejich viskozita je často porovnatelná s typickými oleji. Mohou se jevit jako viskóznější než sojový olej, ale poněkud méně viskózní než glycerin. [33]

Teploty tání RTILů jsou závislé na symetričnosti kationtů. RTILy se symetričtějšími kationty reprezentují soli s vyšší T_f než soli s nesymetrickými kationty. Obecně je T_f také závislá na velikosti kationtu a aniontu. RTILy s nízkou T_f mají velký kation a malý anion.



Obr. 1.7.2 Graf znázorňuje nasycení vodou, tzv. hydrofobních RTILů při laboratorní teplotě v závislosti na délce alkylového řetězce a typu aniontu. Bíle je zobrazeno nasycení $[C_nMIM][PF_6^-]$ ($n = 4-8$) a šedě $[C_nMIM][BF_4^-]$ ($n = 6-10$), n označuje počet uhlíkových atomů alkylového řetězce. [35]



Obr.1.7.3 Graf znázorňuje množství absorbované vody RTILem jako vzdušné vlhkosti za laboratorní teploty v závislosti na době expozice. (*) $[C_8MIM]Cl$, (Δ) $[C_8MIM][NO_3]$, (o) $[C_4MIM][BF_4]$, (\square) $[C_4MIM][PF_6]$. [35]

Využití RTILů

RTILy byly, jsou a budou využívány pro řadu aplikací. V analytické chemii jsou používány pro elektrochemii jako základní elektrolyty (mají široké potenciálové okno, některé až 4 V) a média pro přípravu elektrod, v separačních metodách pro plynovou a kapalinovou chromatografii, elektroforézu a hmotnostní spektrometrii, jako rozpouštědla pro spektroskopii a další.

V organické chemii nahrazují těkavá a toxická rozpouštědla pro syntézy, extrakce a bio-enzymatické reakce.

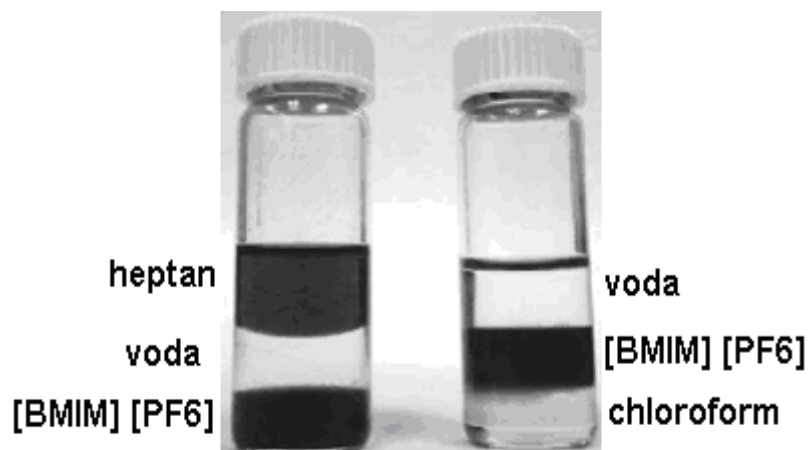
V biochemii slouží jako nevodná média pro biokatalýzy a řadu biologicky aktivních látek, které si v přítomnosti RTILu zachovávají svou bioaktivitu. V chemické analýze se čistých rozpouštědel s RTILy využívá zředěná. Častěji jsou RTILy používány ve směsích v různém poměru k získání požadované vlastnosti, např. eluční síly v kapalinové chromatografii. [28, 30, 31]

Využití RTILů v elektrochemii

Díky nehořlavosti a vysoké iontové vodivosti jsou RTILy použitelné pro elektrochemii. Lze je využít jako základní elektrolyty, na které jsou kladeny vysoké nároky vzhledem k jejich chování při prováděné analýze a také jejich případné interakci s analytem. Dobrý elektrolyt by měl mít vysokou vodivost, široké potenciálové okno, výbornou teplotní a chemickou stabilitu a zanedbatelnou těkavost. Bylo zjištěno, že RTILy jako základní elektrolyty tyto podmínky splňují a je možné dosáhnout širšího rozmezí operačních teplot a podmínek v porovnání s konvenčními elektrolyty. To vše dělá z RTILů slibné materiály v mnoha aplikacích pro elektrochemii jako např. baterie, palivové články, senzory, elektrody. [28, 30, 31, 36]

Díky vysoké viskozitě je lze použít jako pastovací kapaliny pro přípravu CILE, MWCNTE a SWCNTE. RTILy lze také použít k modifikaci nebo vytvoření filmu na různých typech uhlíkových elektrod, jako jsou např. GCE, CPE. Mnoho prací zmiňuje vyšší citlivost, ale také vysoké proudové pozadí CPE obsahujících RTIL jako pastovací kapalinu. CILE elektrody vykazují i řadu výhod, jako je např. vysoká vodivost, rychlý přenos elektronu a odolnost vůči znečištění. [37, 38]

1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorofosfát – [BMIM][PF₆] je typickým příkladem RTILu, který s vodou vytváří dvoufázový systém kapalina-kapalina. Je to bezbarvá, až světle žlutá kapalina. Obr. 1.5.4 je názornou ukázkou nemísitelnosti [BMIM][PF₆] s vodou. [30, 31]



Obr. 1.7.4 Ukázka nemísitelnosti [BMIM][PF₆] s vodou. [30]

2. Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

Ambroxol hydrochlorid

(trans-4-[(2-amino-3,5-dibrombenzyl)amino]cyklohexanol) (Sigma-Aldrich)

Zásobní roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v deonizované vodě (Millipore Q-plus System, Millipore, USA). Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány ředěním zásobního roztoku základním elektrolytem. Roztoky byly uchovávány v temnu v chladničce.

Tlumivý roztok dle Brittona-Robinsona

Kyselá složka tlumivého roztoku byla připravována rozpuštěním přesně odváženého množství 2,744 g kyseliny borité (Lachema Brno) v deonizované vodě (Millipore Q-plus System, Millipore, USA) a smísením s 2,7 ml kyseliny fosforečné (85%, $\rho = 1,71$ g/ml, Lachema Brno) a 2,31 ml kyseliny octové (98%, $\rho = 1,06$ g/ml, Lachema Brno) a doplněním do objemu 1 l deonizovanou vodou (Millipore Q-plus System, Millipore, USA). Zásaditá složka tlumivého roztoku byla připravována rozpuštěním přesně odváženého množství 8 g hydroxidu sodného (Lachema Brno) v deonizované vodě (Millipore Q-plus System, Millipore, USA) a doplněním do objemu 1 l deonizovanou vodou (Millipore Q-plus System, Millipore, USA).

Tlumivý roztok o daném pH byl připravován smísením vodného roztoku kyselé složky pufru a vodného roztoku hydroxidu sodného.

Přesné hodnoty pH byly měřeny pH metrem.

Zásobní roztoky dalších chemikálií:

Zásobní roztok chloridu draselného (Lach-Ner, Neratovice) o koncentraci 0,5 mol/l a 0,1 mol/l byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v deonizované vodě (Millipore Q-plus System, Millipore, USA).

Zásobní roztok hexakyanoželezitanu draselného (Lachema Brno)

o koncentraci $5 \cdot 10^{-2}$ mol/l byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v deonizované vodě (Millipore Q-plus System, Millipore, USA).

Zásobní roztok kyseliny askorbové (Penta) o koncentraci $3 \cdot 10^{-2}$ mol/l byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v deonizované vodě (Millipore Q-plus System, Millipore, USA).

Zásobní roztok síranu železnatého (Lachema Brno) o koncentraci $5 \cdot 10^{-2}$ mol/l byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v 0,05 mol/l kyselině sírové, ze které byl vybubláním dusíkem odstraněn kyslík.

Zásobní roztok kyseliny sírové o koncentraci 0,05 mol/l byl připraven zředěním koncentrované kyseliny sírové (98%, $\rho = 1,06$ g/ml, Lachema Brno) deonizovanou vodou (Millipore Q-plus System, Millipore, USA).

Zásobní roztok hydrochinonu (Lachema Brno) o koncentraci $5 \cdot 10^{-2}$ mol/l a $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v deonizované vodě (Millipore Q-plus System, Millipore, USA).

Příprava uhlíkových past:

GCPE:

Uhlíková pasta byla připravena smísením 250 mg mikrokuliček ze skelného uhlíku o průměru 0,4 – 12 μm (Alpha Aesar, USA) a 90 μl minerálního oleje (Fluka, Biochemika Švýcarsko).

CPE typ 1:

Uhlíková pasta byla připravena smísením 250 mg grafitového prášku (CR 2, Maziva Týn spol.s.r.o., ČR) a 90 μl minerálního oleje (Fluka, Biochemika Švýcarsko).

CPE typ 2:

Uhlíková pasta byla připravena smísením 100 mg grafitového prášku (CR 2, Maziva Týn spol.s.r.o., ČR) a 50 μl minerálního oleje (Fluka, Biochemika Švýcarsko).

IL/CPE:

Uhlíková pasta byla připravena smísením 100 mg grafitového prášku (CR 2, Maziva Týn spol.s.r.o., ČR) a 50 µl minerálního oleje a RTILu v příslušném poměru, minerální olej : RTIL (V/V), který je vždy uveden u každého typu elektrody. Z důvodu lepší přehlednosti textu je dále u jednotlivých typů IL/CPE uváděn pouze objemový díl RTILu.

CILE:

Uhlíková pasta byla připravena smísením 100 mg grafitového prášku (CR 2, Maziva Týn spol.s.r.o., ČR) a 50 µl RTILu.

Používané RTILy:

1-ethyl-3-methylimidazolium trifluormethan sulfonát ([EMIM][CF₃SO₃])
(Fluka, Švýcarsko).

1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorofosfát ([BMIM][PF₆]) (Fluka, Švýcarsko).

Komerční přípravky:

Mucosolvan roztok, obsah ambroxoli hydrochloridum 15 mg/2 ml
(Boehringer Ingelheim, Německo).

Ambrobene roztok, obsah ambroxoli hydrochloridum 15 mg/2 ml (Merckle GmbH, Blaubeuren, Německo).

2.2 Použitá aparatura

Eko-Tribo-Polarograf, verze 3.0 (Polaro sensors, Praha)

Přístroj pracoval v tříelektrodovém systému zapojení:

- pracovní elektroda měla teflonové tělo s nerezovým pístem k vytlačení pasty, aktivní plocha byla kruhová o průměru 2 mm
- referentní elektroda byla argentchloridová s 3 mol/l KCl (ETP CZ R 010-05)
- pomocná elektroda byla platinová elektroda (polaro ETP CZ P 004-05).

2.3 Další používaná zařízení

pH metr:

Digitální měřicí přístroj Conductivity and pH meter 4330 (Jenway, UK)
s kombinovanou skleněnou elektrodou.

Spektrofotometr:

Agilent 8453 (USA), křemenné kyvety tloušťky 1 mm

2.4 Pracovní postupy

2.4.1 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku studované látky

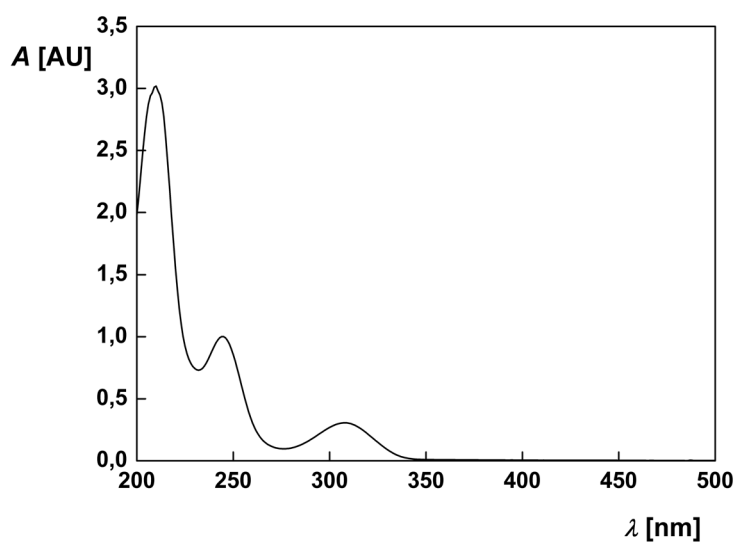
Stálost zásobního roztoku byla sledována spektrofotometricky.

Absorpční spektrum dané látky bylo proměřováno v zásobním roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l proti deonizované vodě v křemenných kyvetách tloušťky 1 mm v rozsahu vlnových délek od 200 nm do 500 nm.

Absorbance byla sledována při vlnové délce 245 nm po dobu 7 měsíců. Bylo zjištěno, že roztok je po tuto dobu stálý při uchování v temnu v chladničce. UV/VIS spektrum ambroxolu je ukázáno na obr. 2.1, v tab. 2.1 jsou uvedeny absorbance naměřené ve dnech sledování stability zásobního roztoku.

Tab. 2.1 Absorbance zásobního roztoku ambroxolu o $c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l v deonizované vodě.

t [dny]	$\lambda = 245 \text{ nm}$	
	A	%
0	1,001	100,0
2	0,989	98,8
7	0,988	98,7
16	0,936	93,5
20	1,038	103,7
30	0,964	96,3
44	0,955	95,4
72	0,959	95,8
90	0,952	95,1
183	0,986	98,5
203	0,990	98,9



Obr. 2.1 UV-VIS spektrum ambroxolu o $c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Měřeno v 1mm křemenných kyvetách proti deonizované vodě.

2.4.2 Voltametrické stanovení ambroxolu

K měření byl použit roztok ambroxolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l. K detekci studované látky bylo použito tříelektrodového voltametrického uspořádání s pracovní uhlíkovou pastovou elektrodou (GCPE, CPE typ 1, 2), popř. elektrodou obsahující RTIL místo minerálního oleje (CILE) nebo elektrodu modifikovanou RTILem (IL/CPE), referenční argentchloridovou elektrodou a pomocnou platinovou elektrodou.

Detekce ambroxolu byla prováděna diferenční pulzní voltametrií při rychlosti polarizace elektrody 20 mV/s, šířce pulzu 80 mV a výšce pulzu 50 mV a diferenční pulzní voltametrií s akumulací ambroxolu na elektrodu. Byl měřen vliv pH Brittonova-Robinsonova pufru na výšky píků ambroxolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l v rozmezí pH = 2 až 12 metodou diferenční pulzní voltametrie.

Při optimálním pH byly proměřeny kalibrační závislosti metodou diferenční pulzní voltametrie.

2.4.3 Akumulace ambroxolu

Byla měřena diferenční pulzní voltametrie s akumulací ambroxolu o koncentraci $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l na GCPE. Byl zjišťován optimální potenciál akumulace vkládaný na elektrodu, a to v rozmezí 500 až 1000 mV, a dále byla zjišťována optimální doba akumulace, a to v časech 0,5 min, 1 min, 2 min, 3 min, 5 min. Jako optimální byl zvolen potenciál 900 mV a doba akumulace 1 min.

Byly proměřeny kalibrační závislosti za výše uvedených optimálních podmínek v Brittonově-Robinsonově pufru o pH = 2 na GCPE.

2.5 Vývoj elektrody obsahující RTIL

Jak již bylo v úvodu uvedeno, RTILů, které se liší svými vlastnostmi, je celá řada. Pro přípravu CILE, kde byl minerální olej plně nahrazen RTILEm, popř. přípravu IL/CPE, kde byla provedena pouze modifikace CPE RTILEm, byly použity dva RTILy s více či méně odlišnými vlastnostmi. Jako první byl použit 1-ethyl-3-methylimidazolium trifluormethansulfonát ([EMIM][CF₃SO₃]) a následně 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorofosfát ([BMIM][PF₆]).

Zkoumání vlastností jednotlivých typů elektrod bylo prováděno metodou diferenční pulzní voltametrie při rychlosti polarizace elektrody 20 mV/s, šířce pulzu 80 mV a výšce pulzu 50 mV a metodou cyklické voltametrie při rychlosti polarizace elektrody 100 mV/s.

2.5.1 1-Ethyl-3-methylimidazolium trifluormethansulfonát ([EMIM][CF₃SO₃])

Jako první byl použit 1-ethyl-3-methylimidazolium trifluormethansulfonát. RTILEm byl nejprve nahrazen minerální olej a elektroda byla připravena z mikrokuliček skelného uhlíku a RTILu v poměru 70:30 (w/w) a 75:25 (w/w). S oběma typy elektrod byla provedena detekce amroxolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l v Brittonově-Robinsonově pufru o pH = 2, 7 a 12 pomocí diferenční pulzní voltametrie. [34, 36]

Vzhledem k tomu, že většina publikovaných prací využívala pro přípravu elektrod grafitového prášku, byla připravena elektroda s grafitovým práškem a RTILEm, který zcela nahradil minerální olej v elektrodě (CILE), tedy se 100% obsahem RTILu v elektrodě, a dále také elektrody IL/CPE s různým poměrem minerální olej : RTIL (V/V) a CPE typ 2. [39, 42, 43]

Ke zkoumání chování jednotlivých typů elektrod byly jako standardní látky použity hexakynoželezitan draselný o koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l a kyselina askorbová o koncentraci $3 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Pro hexakynoželezitan draselný byl jako základní elektrolyt použit 0,5 mol/l KCl a pro kyselinu askorbovou Brittonův-Robinsonův pufr o pH = 6,5. Chování látek na příslušných elektrodách bylo zkoumáno pomocí cyklické voltametrie. [40]

Některé z publikovaných prací uvádějí, že elektrody byly po nebo během přípravy homogenizovány. Většinou zahříváním nad teplotu tání RTILu po určitou dobu. Toto zjištění vedlo k myšlence, že elektroda by mohla mít lepší vlastnosti, podobně jako klasická CPE, po samovolné homogenizaci. Byla proto po přípravě volně nechána, stejně jako klasická CPE, 24 hodin a pak použita k měření. Následně byly vyzkoušeny i jiné způsoby homogenizace, např. ohřívání elektrody IČ lampou a ponechání elektrody v ultrazvuku po různé dlouhou dobu nebo smísení RTILu a minerálního oleje ve vialce a ponechání v ultrazvukové lázni. Vlastnosti elektrody se výrazným způsobem nezměnily. [36, 40, 41]

Byly provedeny pokusy stanovit ambroxol o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l na elektrodách CILE a IL/CPE s 50, 25, 10% obsahem RTILu v elektrodě pomocí diferenční pulzní voltametrie.

Protože bylo předchozími experimenty zjištěno, že ambroxol se na GCPE neakumuluje, byla vyzkoušena možnost akumulace ambroxolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l na IL/CPE s 25, 10 a 5% obsahem RTILu v elektrodě. Všechny pokusy stanovení ambroxolu byly prováděny v Brittonově-Robinsonově pufru o $\text{pH} = 2$.

2.5.2 1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorofosfát

([BMIM][PF₆])

Jako druhý RTIL byl použit 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorofosfát. Stejně jako v prvním případě bylo chování elektrody zkoumáno pomocí hexakynoželezitanu draselného a dále také pomocí síranu železnatého a hydrochinonu.

Nejdříve byla k měření opět použita klasická CPE typ 2, na které bylo zjištěno chování vybraných standardních látek (poloha, výška píku). Následně byla připravena elektroda se 100% obsahem RTILu v elektrodě (CILE). Hexakynoželezitan draselný byl stanoven cyklickou voltametrií v 0,5 mol/l KCl jako základním elektrolytu. Dále bylo postupováno stejným způsobem jako u prvního RTILu snižováním obsahu RTILu v elektrodě, tedy přípravou IL/CPE s 50 a 25% obsahem RTILu v elektrodě.

Následně byla měřena diferenční pulzní voltametrie hexakynoželezitanu draselného v 0,5 a 0,1 mol/l KCl a v Brittonově Robinsonově pufru o pH = 2. Měření bylo prováděno na CPE typ 2, CILE a IL/CPE s 50 a 25% obsahem RTILu v elektrodě.

Stejně jako u [EMIM][CF₃SO₃] byly provedeny pokusy stanovení ambroxolu metodou diferenční pulzní voltametrie v Brittonově-Robinsonově pufru o pH = 2. K měření byl používán roztok ambroxolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Měření bylo prováděno na CPE typ 2, CILE a IL/CPE s 50, 25 a 10% obsahem RTILu v elektrodě.

S další studovanou látkou, síranem železnatým, bylo vzhledem k jeho velmi snadné samovolné oxidaci pracováno v prostředí inertního plynu. Roztok byl probubláván dusíkem mezi jednotlivými měřeními a při měření byla nad roztokem udržována inertní atmosféra. Síran železnatý byl rozpuštěn v 0,05 mol/l kyselině sírové pro zvýšení stability roztoku, také její roztok byl zbaven kyslíku bubláním dusíkem. Se síranem železnatým byla provedena cyklická voltametrie a diferenční pulzní voltametrie s elektrodami CPE typ 2, CILE a IL/CPE s 50 a 25% obsahem RTILu v elektrodě v 0,5 mol/l KCl jako základním elektrolytu. KCl byl též zbaven kyslíku bubláním dusíkem.

Jako další studovaná látka, která má v roztoku záporný náboj, byl zvolen hydrochinon, jako vhodný zástupce fenolů. Hydrochinon byl rozpuštěn v deonizované vodě. Byla měřena cyklická voltametrie a diferenční pulzní voltametrie s elektrodami CPE typ 2, CILE a IL/CPE s 50 a 25% obsahem RTILu v elektrodě v 0,5 mol/l KCl jako základním elektrolytu. Bylo zjištěno, že hydrochinon je stálý v kyselém prostředí, v zásaditém prostředí se samovolně oxiduje na chinon. Z toho důvodu byl proměřen vliv pH Brittonova-Robinsonova pufru na výšku píku a to pouze v prostředích o pH = 2, 4, 6, 8. Detekce byla prováděna na CPE typ 2 a na IL/CPE s 25% obsahem RTILu v elektrodě. Byly porovnány výšky a tvary píků pro oba typy elektrod. Dále byl vyzkoušen vliv silně kyselého prostředí na výšku píku, a to 0,05 mol/l a 0,1 mol/l kyseliny fosforečné. Byly proměřeny kalibrační závislosti hydrochinonu na obou elektrodách, CPE typ 2 a na IL/CPE s 25% obsahem RTILu v elektrodě, v prostředí 0,1 mol/l kyseliny fosforečné. Byla vyhodnocena a porovnána mez detekce na obou typech elektrod. [42, 43]

2.6 Stanovení ambroxolu v komerčních přípravcích

Ambroxol byl stanoven ve dvou komerčně dodávaných přípravcích metodou diferenční pulzní voltametrie. Stanovení obsahu ambroxolu bylo provedeno metodou standardního přídatku. Zásobní roztok byl připraven zředěním léčiva deonizovanou vodou na koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Ze zásobního roztoku byly připraveny pracovní roztoky o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l zředěním Brittonovým-Robinsonovým pufrům o pH = 2, které odpovídalo optimálnímu zjištěnému pH stanovení ambroxolu na CPE typ 1. Standardní roztok ambroxolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství ambroxolu v deonizované vodě.

Vlastní stanovení léčiva v komerčním přípravku bylo provedeno třemi standardními přídatky o objemu 50 μ l a koncentraci $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l. Po každém přídatku byla provedena tři stanovení ambroxolu na CPE typ 1. Získaná data byla statisticky zpracována. Byl vypočten obsah ambroxolu v přípravku, relativní směrodatná odchylka stanovení, interval spolehlivosti a výtěžek. Získané vypočtené množství ambroxolu v přípravku bylo porovnáno s hodnotou udávanou výrobcem.

3. Výsledky a diskuze

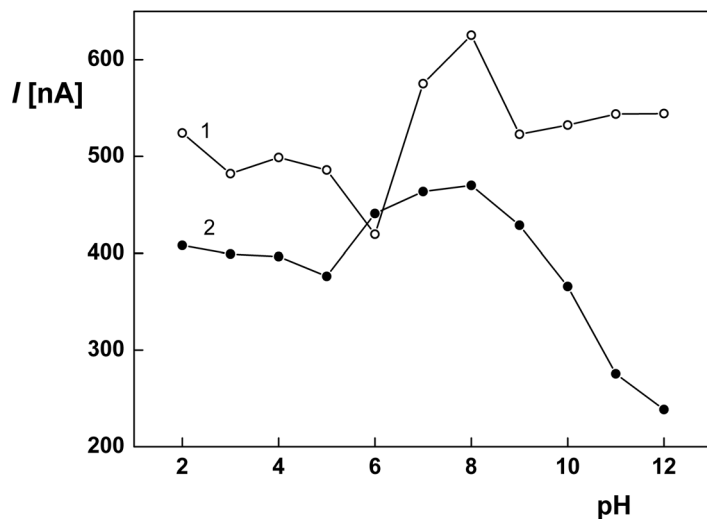
3.1 Voltametrické stanovení ambroxolu

Pro určení optimálního pH základního elektrolytu Brittonova-Robinsonova pufru byl proměřen vliv pH na výšky píků. V oblasti od pH = 2 do pH = 12. Tyto závislosti byly proměřeny na GCPE a CPE typ 1 a porovnány. Na obr. 3.1.1 je uvedeno porovnání vlivu pH na výšky píku pro obě elektrody.

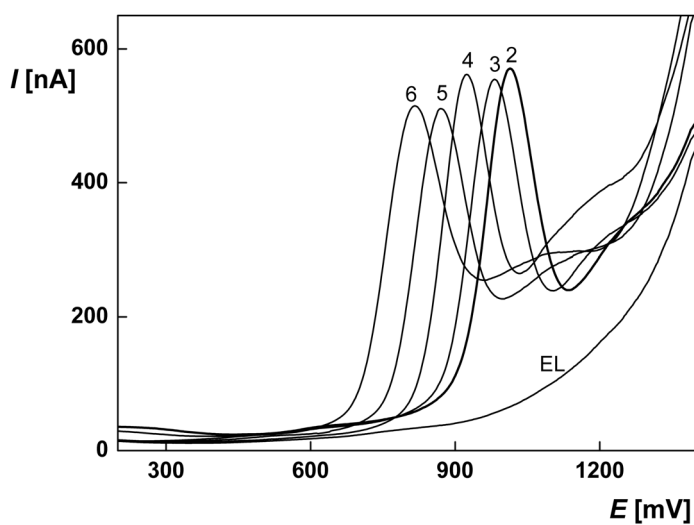
Při měření byly pozorovány dva píky jdoucí za sebou. Při zásaditějším pH začaly píky splývat a nebylo je možné opakovaně vyhodnotit. Vyhodnocován byl pouze první pík, který byl symetričtější a vyšší.

Z porovnání závislostí vlivu pH na výšky píků není zřejmý ani pro jednu z elektrod výrazný trend ve vlivu pH na výšku píku. Jako optimální pH bylo vybráno pH = 2, a to z důvodu dobrého oddělení obou píků analytu od sebe a symetrie píků. Při pH = 8 byly píky analytu nejvyšší, ale nedocházelo již k jejich dokonalému oddělení, proto nebylo při analýze využíváno.

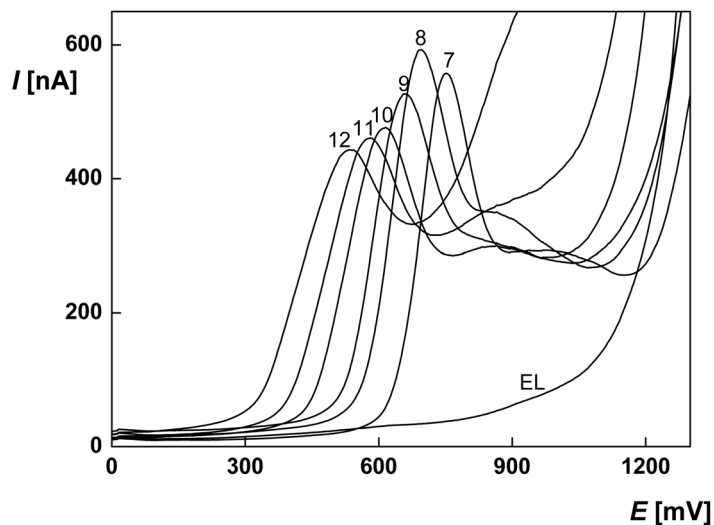
Na obr. 3.1.2 a 3.1.3 jsou uvedeny DP voltamogramy ambroxolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l pro rozmezí pH = 2 až 6 a pH = 7 až 12 naměřené na GCPE. Na obr. 3.1.4 a 3.1.5 jsou uvedeny DP voltamogramy ambroxolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l pro rozmezí pH = 2 až 6 a pH = 7 až 12 naměřené na CPE typ 1.



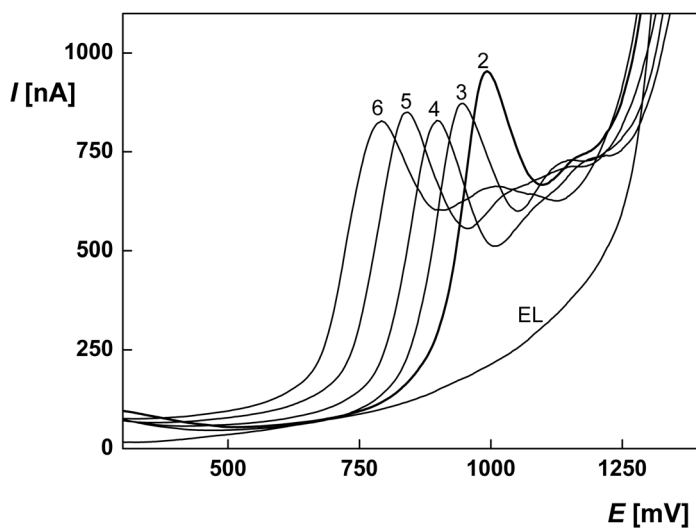
Obr. 3.1.1 Porovnání vlivu pH B-R pufru na výšky píků ambroxolu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l). (1) GCPE, (2) CPE typ 1.



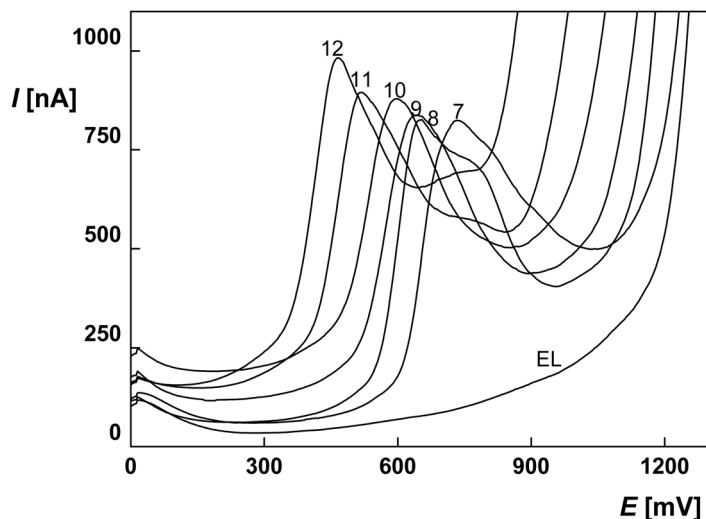
Obr. 3.1.2 DP voltamogramy ambroxolu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) měřené na GCPE v prostředí B-R pufru. Číslo nad křivkou označuje pH B-R pufru, EL křivku základního elektrolytu pro pH = 2 B-R pufru.



Obr. 3.1.3 DP voltamogramy ambroxolu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) měřené na GCPE v prostředí B-R pufru. Číslo nad křivkou označuje pH B-R pufru, EL křivku základního elektrolytu pro pH = 7 B-R pufru.



Obr. 3.1.4 DP voltamogramy ambroxolu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) měřené na CPE typ 1 v prostředí B-R pufru. Číslo nad křivkou označuje pH B-R pufru, EL křivku základního elektrolytu pro pH = 2 B-R pufru.



Obr. 3.1.5 DP voltamogramy ambroxolu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) měřené na CPE typ 1 v prostředí B-R pufru. Číslo nad křivkou označuje pH B-R pufru, EL křivku základního elektrolytu pro pH = 7 B-R pufru.

3.2 Kalibrační závislosti ambroxolu

Kalibrační závislosti měřené na GCPE a CPE typ 1 byly proměřeny ve stejném rozmezí koncentrací od $1 \cdot 10^{-4}$ do $4 \cdot 10^{-6}$ mol/l v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru o pH = 2.

Kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Mez detekce byla stanovena jako množství analytu poskytující signál, jehož výška je rovna trojnásobku směrodatné odchylky stanovení při nejnižší dosažené koncentraci. Meze detekce spolu s parametry kalibračních závislostí pro jednotlivé elektrody jsou uvedeny v tabulce 3.2.1 a 3.2.2. Na obr. 3.2.1 a 3.2.2 jsou zobrazeny kalibrační závislosti ambroxolu měřené v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ – $4 \cdot 10^{-6}$ mol/l na GCPE a na CPE typ 1. Na obr. 3.2.3 a 3.2.4 jsou znázorněny DP voltamogramy pro koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ až $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l naměřené na GCPE a CPE typ 1.

Porovnáním parametrů kalibračních závislostí pro jednotlivá koncentrační rozmezí u GCPE i CPE typ 1 lze říci, že se směrnice kalibračních závislostí pro

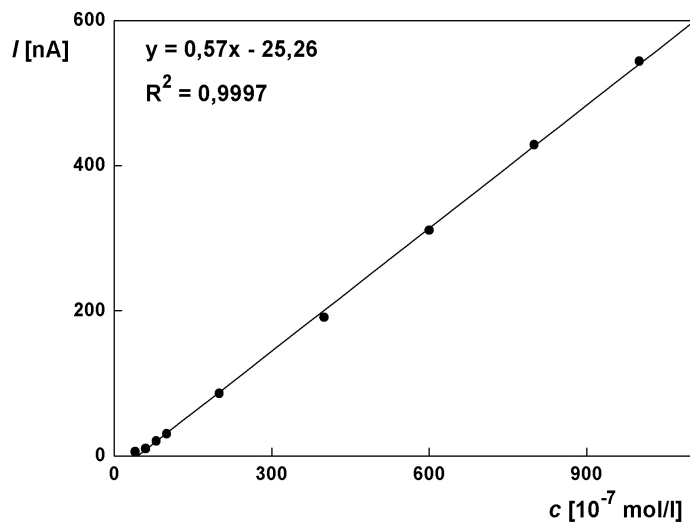
koncentrační rozmezí $1.10^{-4} - 1.10^{-5}$ mol/l poněkud liší od $1.10^{-5} - 4.10^{-6}$ mol/l, což je pravděpodobně způsobeno chybou měření při snižování koncentrace analytu ve vzorku. Hodnoty korelačních koeficientů se blíží jedné, lze tedy kalibrační závislosti pro oba typy použitých elektrod, GCPE i CPE typ 1, považovat za lineární v daném naměřeném koncentračním rozmezí $1.10^{-4} - 4.10^{-6}$ mol/l. Při porovnání parametrů kalibračních závislostí a mezí detekce získaných pro oba typy elektrod mezi sebou, vykazuje GCPE lepší shodu směrnic, vyšší korelační koeficienty a nižší mez detekce oproti CPE typ 1, avšak jejich absolutní hodnoty nejsou výrazně odlišné. Nelze tedy jednoznačně určit, která z použitých elektrod je výrazně lepší či horší.

Tab. 3.2.1 Parametry kalibračních závislostí amroxolu pro GCPE.

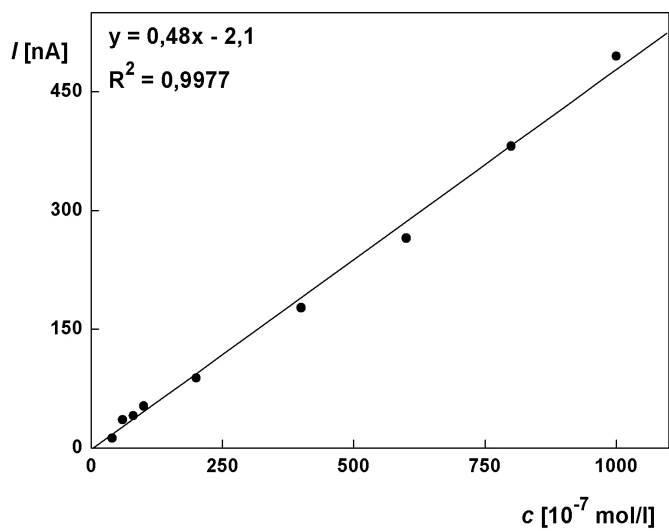
Koncentrační rozmezí [mol/l]	směrnice [10^7 nA.l/mol]	úsek [nA]	R^2
$1.10^{-4} - 1.10^{-5}$	0,57	-30,5	0,9998
$1.10^{-5} - 4.10^{-6}$	0,42	-13,2	0,9861
$1.10^{-4} - 4.10^{-6}$	0,57	-25,3	0,9997
$LOD = 2,5.10^{-6}$ mol/l			

Tab. 3.2.2 Parametry kalibračních závislostí amroxolu pro CPE typ 1.

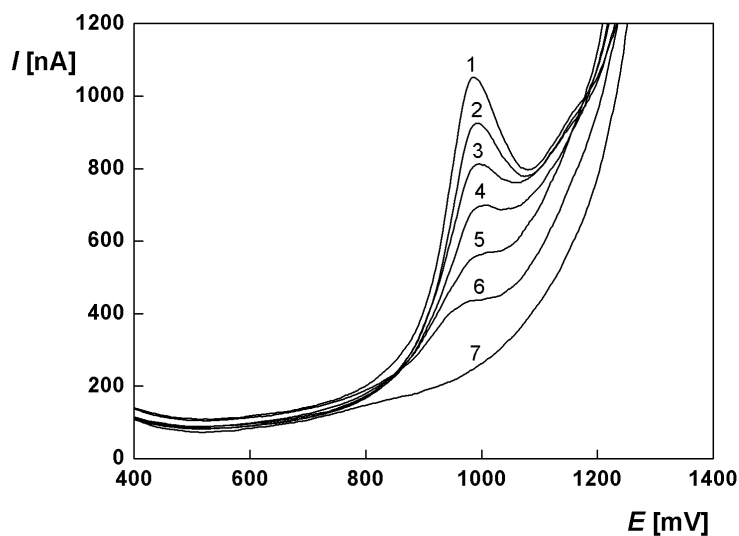
Koncentrační rozmezí [mol/l]	směrnice [10^7 nA.l/mol]	úsek [nA]	R^2
$1.10^{-4} - 1.10^{-5}$	0,49	-10,4	0,9971
$1.10^{-5} - 4.10^{-6}$	0,63	-9,0	0,9629
$1.10^{-4} - 4.10^{-6}$	0,48	- 2,1	0,9977
$LOD = 2,0.10^{-6}$ mol/l			



Obr. 3.2.1 Kalibrační závislost amroxolu pro koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ až $4 \cdot 10^{-6}$ mol/l, měřeno technikou DPV v prostředí B-R pufru o pH = 2 na GCPE.

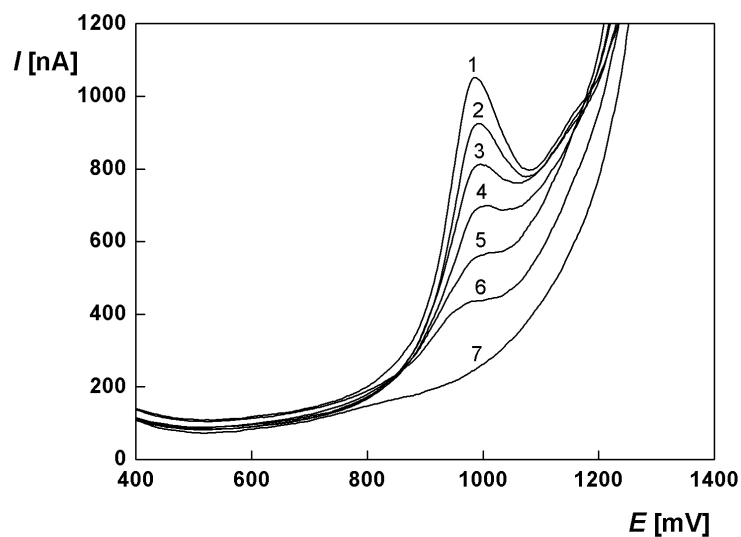


Obr. 3.2.2 Kalibrační závislost amroxolu pro koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ až $4 \cdot 10^{-6}$ mol/l, měřeno technikou DPV v prostředí B-R pufru o pH = 2 na CPE typ 1.



Obr. 3.2.3 DP voltamogramy ambroxolu pro koncentrační rozmezí

1.10^{-4} až 1.10^{-5} mol/l naměřené na GCPE v prostředí B-R pufru o pH = 2. (1) 1.10^{-4} , (2) 8.10^{-5} , (3) 6.10^{-5} , (4) 4.10^{-5} , (5) 2.10^{-5} , (6) 1.10^{-5} , (7) základní elektrolyt.



Obr. 3.2.4 DP voltamogramy ambroxolu pro koncentrační rozmezí 1.10^{-4} až

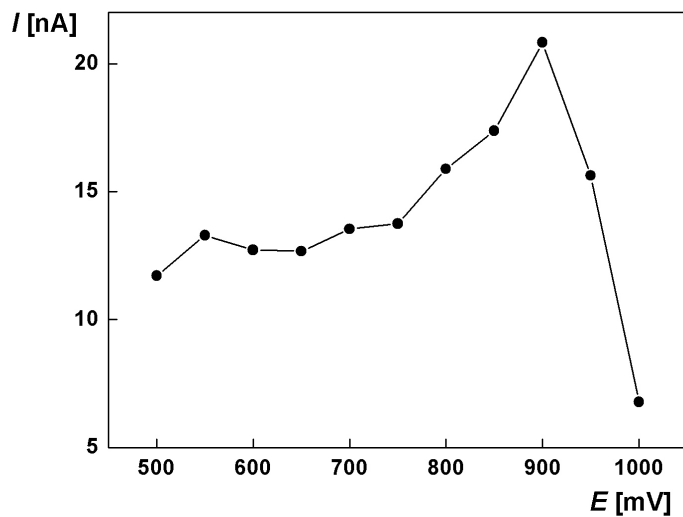
1.10^{-5} mol/l naměřené na CPE typ 1 v prostředí B-R pufru o pH = 2. (1) 1.10^{-4} , (2) 8.10^{-5} , (3) 6.10^{-5} , (4) 4.10^{-5} , (5) 2.10^{-5} , (6) 1.10^{-5} , (7) základní elektrolyt.

3.3 Akumulace ambroxolu

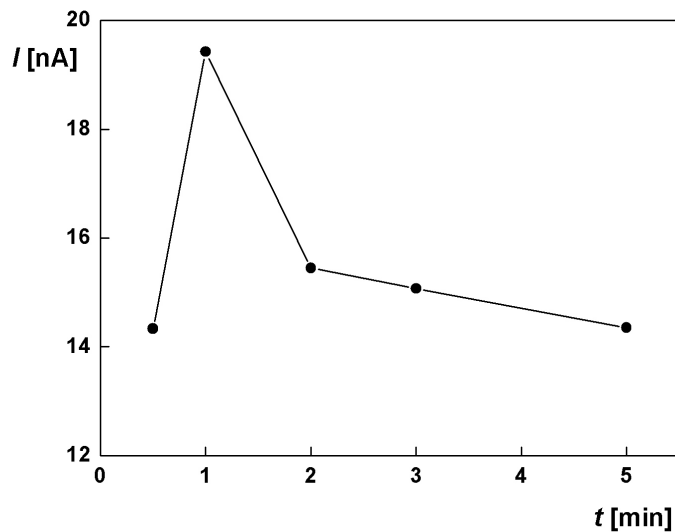
Možná adsorpční akumulace ambroxolu na CPE byla studována pomocí diferenční pulzní voltametrie na GCPE s roztokem ambroxolu o koncentraci $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l v Brittonově-Robinsonově pufru o pH = 2. Zkoumaná látka se neakumulovala, výšky píků se prakticky nezvětšily. Na obr. 3.3.1 je ukázán vliv potenciálu vkládaného na elektrodu na výšku píku v rozmezí 500 až 1000 mV, na obr. 3.3.2 je ukázán vliv doby akumulace na výšku píku, a to 0,5 min, 1 min, 2 min, 3 min, 5 min. Jako optimální byl zvolen potenciál 900 mV a doba akumulace 1 min, při těchto podmínkách byly píky nejvyšší, ovšem nedosahovaly ani dvojnásobku výšky píku bez akumulace.

Za výše uvedených optimálních podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti na GCPE v Brittonově-Robinsonově pufru o pH = 2. Při porovnání směrnic kalibračních závislostí pro koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l a pro $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l je zřejmé, že se od sebe poněkud liší, což je pravděpodobně způsobeno chybou měření při snižování koncentrace analytu ve vzorku. Kalibrační závislost je v naměřeném koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l lineární vzhledem k hodnotě korelačního koeficientu blízcímu se jedné. Kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Mez detekce byla stanovena jako množství analytu poskytující signál, jehož výška je rovna trojnásobku směrodatné odchylky stanovení při nejnižší dosažené koncentraci. Mez detekce spolu s parametry kalibrační závislosti jsou uvedeny v tabulce 3.3.1. Na obr. 3.3.3 jsou zobrazeny kalibrační závislosti v celém měřeném koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l.

Akumulací látky na elektrodu nebylo dosaženo výrazného snížení meze detekce stanovované látky oproti kalibrační závislosti bez akumulace. Protože obě uhlíkové pastové elektrody se chovaly podobně, nebyl vzhledem ke zjištěným skutečnostem studován vliv akumulace ambroxolu na CPE typ 1.



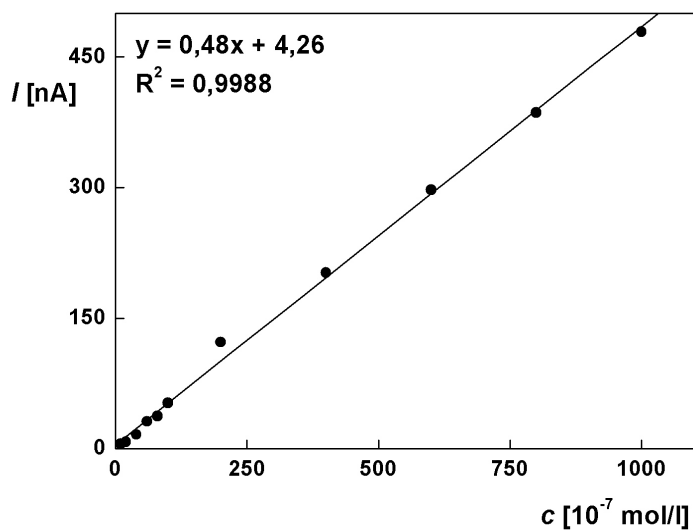
Obr. 3.3.1 Vliv potenciálu vkládaného na elektrodu na výšku píku ambroxolu ($c = 5 \cdot 10^{-6}$ mol/l) při jeho akumulaci na GCPE, měřeno metodou DPV s akumulací v prostředí B-R pufru o pH = 2.



Obr. 3.3.2 Vliv doby akumulace na výšku píku ambroxolu ($c = 5 \cdot 10^{-6}$ mol/l) při jeho akumulaci na GCPE, měřeno metodou DPV v prostředí B-R pufru o pH = 2.

Tab. 3.3.1 Parametry kalibračních závislostí akumulace ambroxolu na GCPE.

Koncentrační rozmezí [mol/l]	směrnice [10 ⁷ nA.l/mol]	úsek [nA]	R ²
1.10 ⁻⁴ – 1.10 ⁻⁵	0,46	17,6	0,9989
1.10 ⁻⁵ – 1.10 ⁻⁶	0,52	-1,9	0,9920
1.10 ⁻⁴ – 1.10 ⁻⁶	0,48	4,3	0,9988
LOD = 1,3.10⁻⁶ mol/l			



Obr. 3.3.3 Kalibrační závislost ambroxolu v koncentračním rozmezí 1.10⁻⁴ – 1.10⁻⁶ mol/l, měřeno technikou DPV s akumulací při potenciálu 900 mV a době akumulace 1 min v prostředí B-R pufru o pH = 2 na GCPE.

3.4 Vývoj elektrody obsahující RTIL

K přípravě IL/CPE a CILE byly použity dva RTILy. Jako první byl použit 1-ethyl-3-methylimidazolium trifluormethansulfonát, se kterým byly provedeny první pokusy zkoumání vlastností elektrody. Jako druhý RTIL byl vybrán 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorofosfát, se kterým bylo chování elektrod zkoumáno podrobněji.

3.4.1 1-Ethyl-3-methylimidazolium trifluormethansulfonát ([EMIM][CF₃SO₃])

První pokusy provedené s elektrodou připravenou z mikrokuliček skelného uhlíku a RTILu v poměru 70:30 (w/w) a 75:25 (w/w) ukázaly, že ambroxol není možné pomocí těchto elektrod detekovat vzhledem k obrovskému proudovému pozadí elektrody.

K měření standardních látek byla nejdříve použita klasická CPE typ 2, na které bylo zjištěno chování vybraných standardních látek (poloha, výška píku) pro pozdější porovnání dat získaných na CILE a IL/CPE. Na CPE typ 2 a CILE byly proměřeny cyklické voltamogramy hexakynoželezitanu draselného a kyseliny askorbové. Při měření s CILE nebylo možné nalézt žádný pík kyseliny askorbové. Pro hexakynoželezitan draselný byl nalezen jen náznak píku, který byl vidět lépe až po zvětšení.

Dalším krokem byla změna poměru minerální olej : RTIL (V/V) v elektrodě, tedy příprava IL/CPE. Byly připraveny elektrody s obsahem RTILu 50 a 25 %. Tento krok se jevil jako správný, vzhledem ke klesajícímu proudovému pozadí elektrody a možnosti lépe detekovat pík analytu. Na elektrodě obsahující 50 % RTILu byl opět detekován pouze hexakynoželezitan draselný. Kyselina askorbová byla detekována pouze na elektrodě s 25% obsahem RTILu. Bylo zjištěno, že s rostoucím obsahem RTILu v elektrodě roste proud pozadí, který je mnohokrát vyšší než proud pozadí u CPE. Možným vysvětlením tohoto jevu je vysoký nabíjecí proud, který maskuje faradaický proud, a proto není možné nalézt pík studované látky, zvláště při nižších koncentracích analytu. Řada autorů publikovaných prací popisuje podobný problém.

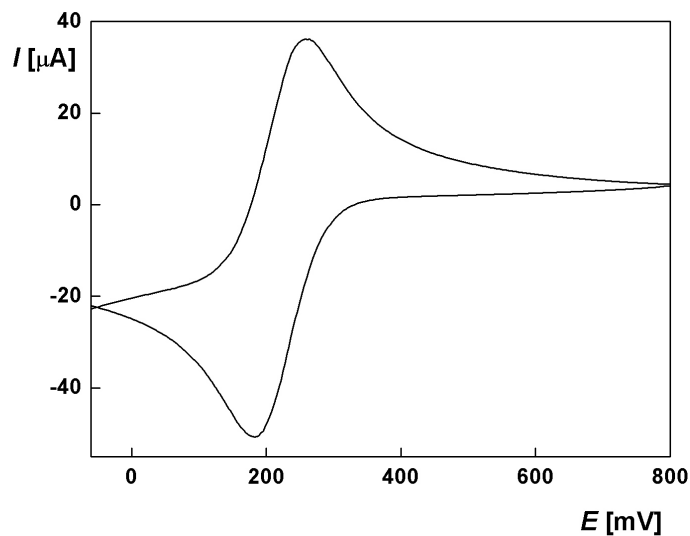
Na obr. 3.4.1.1, 3.4.1.2, 3.4.1.3 a 3.4.1.4 jsou zobrazeny cyklické voltamogramy pro hexakynoželezitan draselný o koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l naměřené na CPE typ 2, CILE a IL/CPE s 50 a 25% obsahem RTILu v elektrodě v 0,5 mol/l KCl jako základním elektrolytu a na obr. 3.4.1.5 a 3.4.1.6 jsou zobrazeny cyklické voltamogramy pro kyselinu askorbovou o koncentraci $3 \cdot 10^{-3}$ mol/l naměřené na CPE typ 2 a IL/CPE s 25% obsahem RTILu v elektrodě. Z cyklických voltamogramů je patrné, že s rostoucím obsahem RTILu v elektrodě roste výška píku. Zároveň s rostoucí výškou píku roste i kapacitní proud elektrody, což při nízkých koncentracích může znemožňovat detekci analytu.

Bylo provedeno měření ambroxolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l na elektrodách CPE typ 2, CILE a IL/CPE s 50, 25 a 10% obsahem RTILu v elektrodě pomocí diferenční pulzní voltametrie. V tab. 3.4.1.1 jsou uvedeny výšky píků naměřené při různém obsahu RTILu v elektrodě. Ambroxol nebylo možné detekovat na elektrodách CILE a IL/CPE s 50% obsahem RTILu v elektrodě kvůli vysokému proudovému pozadí elektrody. Pro nižší obsahy RTILu v elektrodě je patrný vzrůst výšky píku s rostoucím obsahem RTILu.

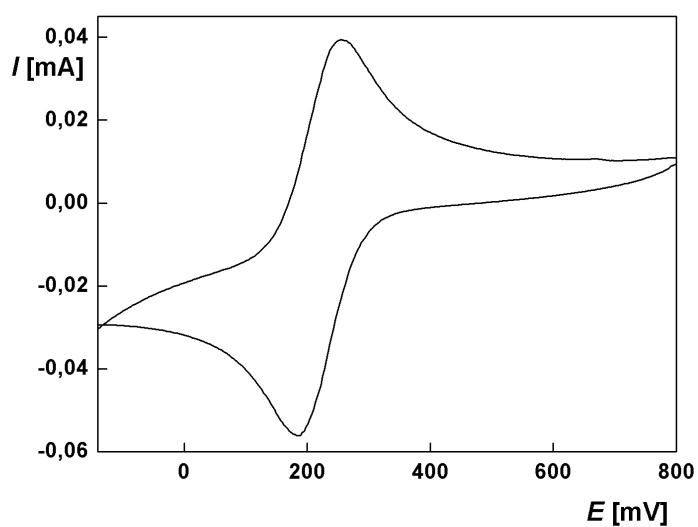
Možnost akumulace ambroxolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l na IL/CPE s 25, 10 a 5% obsahem RTILu v elektrodě se ani pro modifikovanou elektrodu nepotvrdila.

Tab. 3.4.1.1 Vliv obsahu RTILu v elektrodě na výšku píku ambroxolu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l).

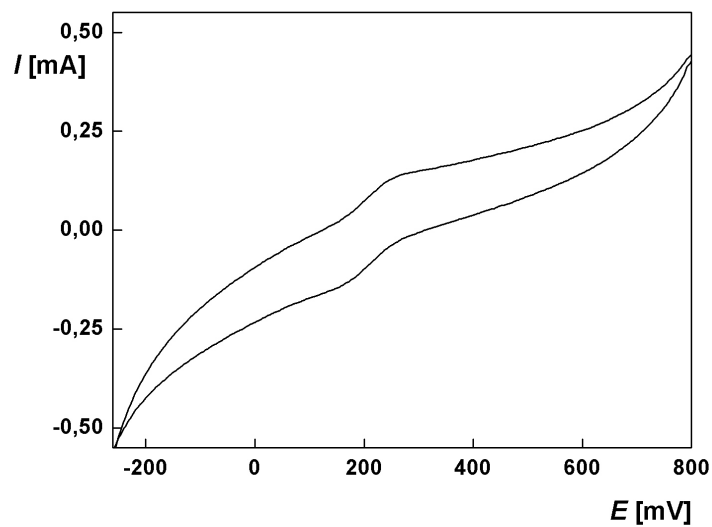
Obsah [EMIM][CF ₃ SO ₃] v elektrodě [%]	I [nA]
0	494,4
10	500,9
25	565,2
50	-
100	-



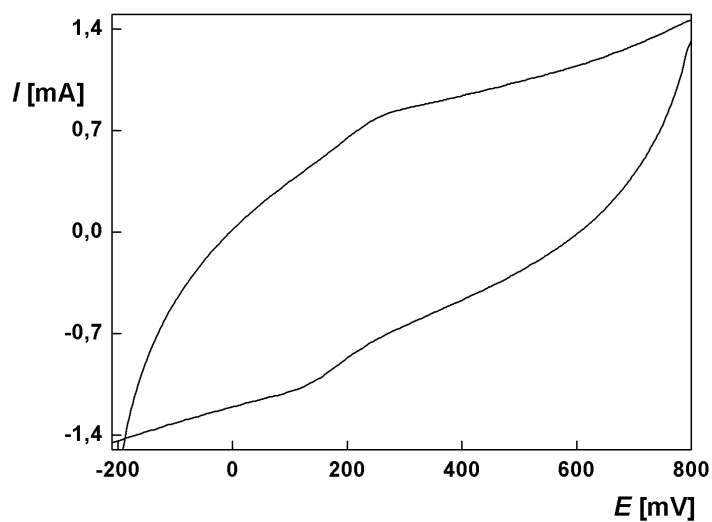
Obr. 3.4.1.1 Cyklický voltamogram $K_3[Fe(CN)_6]$ ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) měřený v prostředí 0,5 mol/l KCl na CPE typ 2.



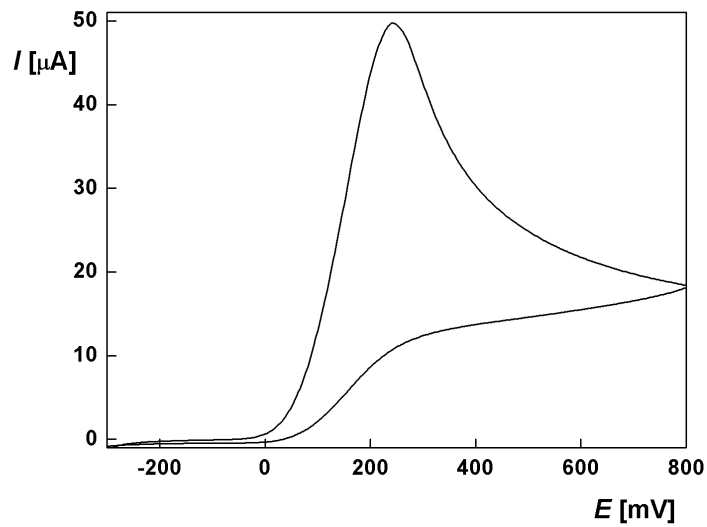
Obr. 3.4.1.2 Cyklický voltamogram $K_3[Fe(CN)_6]$ ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) měřený v prostředí 0,5 mol/l KCl na IL/CPE s 25% obsahem RTILu v elektrodě.



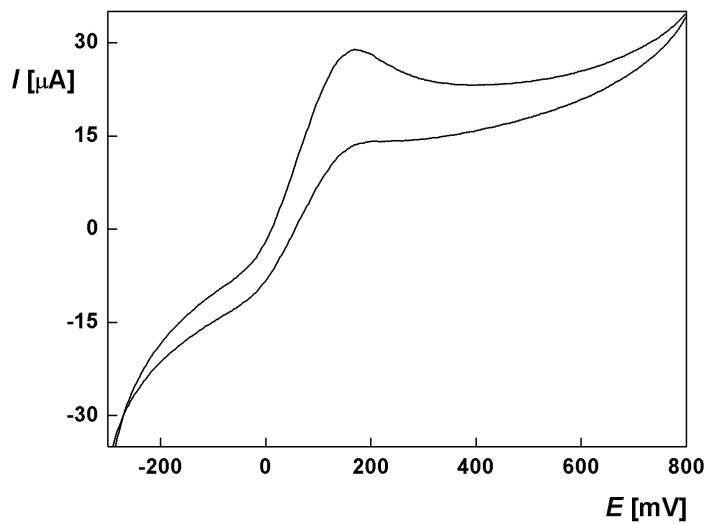
Obr. 3.4.1.3 Cyklický voltamogram $K_3[Fe(CN)_6]$ ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) měřený v prostředí 0,5 mol/l KCl na IL/CPE s 50% obsahem RTILu v elektrodě.



Obr. 3.4.1.4 Cyklický voltamogram $K_3[Fe(CN)_6]$ ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) měřený v prostředí 0,5 mol/l KCl na CILE.



Obr. 3.4.1.5 Cyklický voltamogram kyseliny askorbové ($c = 3 \cdot 10^{-3}$ mol/l) měřený v prostředí B-R pufru o pH = 6,5 na CPE typ 2.



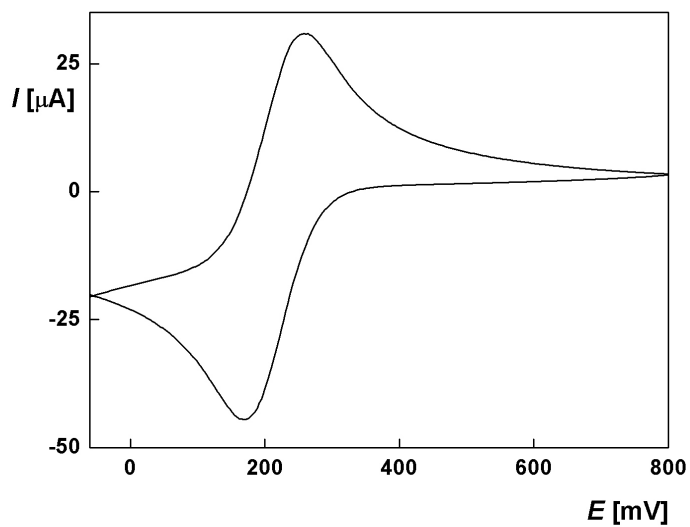
Obr. 3.4.1.6 Cyklický voltamogram kyseliny askorbové ($c = 3 \cdot 10^{-3}$ mol/l) měřený v prostředí B-R pufru o pH = 6,5 na IL/CPE s 25% obsahem RTILu v elektrodě.

3.4.2 1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorofosfát

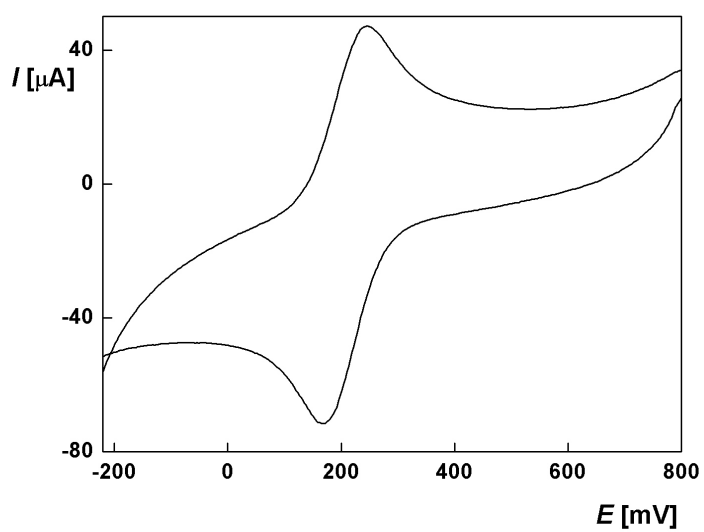
([BMIM][PF₆])

Jako druhý RTIL byl použit 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorofosfát.

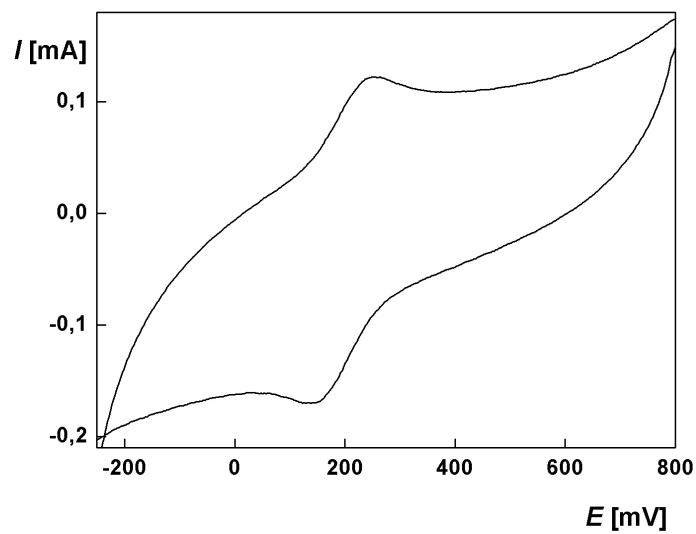
Stejně jako v prvním případě bylo chování elektrody zkoumáno měřením hexakynoželezitanu draselného o koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Hexakynoželezitan draselný byl stanoven cyklickou voltametrií v 0,5 mol/l KCl jako základním elektrolytu na CPE typ 2 a CILE. Dále bylo postupováno stejným způsobem jako u prvního RTILu, tedy snižováním obsahu RTILu v elektrodě a přípravou IL/CPE s 50 a 25% obsahem RTILu v elektrodě. Pro srovnání jsou uvedeny cyklické voltamogramy na obrázcích 3.4.2.1, 3.4.2.2, 3.4.2.3, 3.4.2.4 naměřené na těchto elektrodách pro hexakynoželezitan draselný v prostředí 0,5 mol/l KCl jako základního elektrolytu. I zde se potvrdil stejný trend vzrůstu výšky píku s rostoucím obsahem RTILu v elektrodě jako u prvního RTILu. Při porovnání výšek píků hexakynoželezitanu draselného naměřených cyklickou voltametrií na elektrodách obsahujících [EMIM][CF₃SO₃] a [BMIM][PF₆] je vidět, že výšky píků se významně neliší. Vzrůst nežádoucího nabíjecího proudu s rostoucím obsahem RTILu v elektrodě se potvrdil i u [BMIM][PF₆].



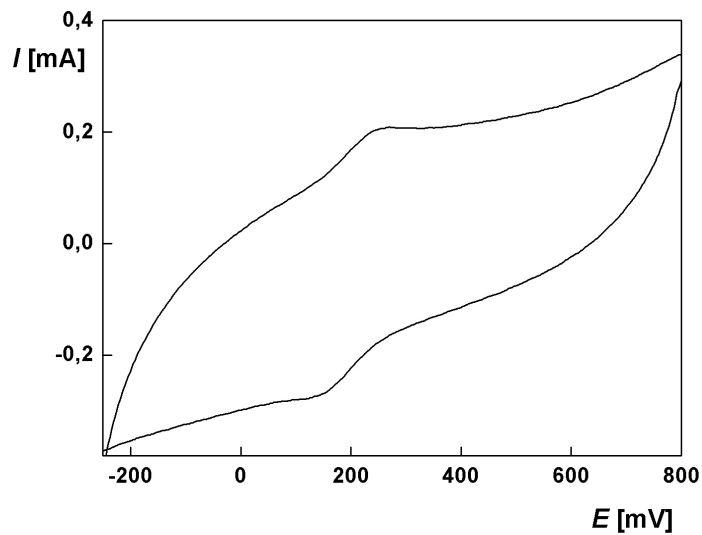
Obr. 3.4.2.1 Cyklický voltamogram $K_3[Fe(CN)_6]$ ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) měřený v prostředí 0,5 mol/l KCl na CPE typ 2.



Obr. 3.4.2.2 Cyklický voltamogram $K_3[Fe(CN)_6]$ ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) měřený v prostředí 0,5 mol/l KCl na IL/CPE s 25% obsahem RTILu v elektrodě.



Obr. 3.4.2.3 Cyklický voltamogram $K_3[Fe(CN)_6]$ ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) měřený v prostředí 0,5 mol/l KCl na IL/CPE s 50% obsahem RTILu v elektrodě.



Obr. 3.4.2.4 Cyklický voltamogram $K_3[Fe(CN)_6]$ ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) měřený v prostředí 0,5 mol/l KCl na CILE.

Byly proměřeny diferenční pulzní voltamogramy hexakynoželezitanu draselného o koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l v 0,5 mol/l, 0,1 mol/l KCl a Brittonově-Robinsonově pufru o pH = 2. Měření bylo prováděno na elektrodách CPE typ 2, CILE a IL/CPE s 50 a 25% obsahem RTILu v elektrodě.

Z porovnání výšek píků změřených pro hexakynoželezitan draselný, viz tab. 3.4.2.1, vyplývá, že v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru o pH = 2 a 0,1 mol/l KCl se jako optimální obsah RTILu v elektrodě jeví 25 %, pak výšky píků klesají. Na rozdíl od prvních dvou prostředí v 0,5 mol/l KCl postupně výška píku roste s rostoucím obsahem RTILu v elektrodě.

Pro srovnání stanovení ambroxolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l metodou diferenční pulzní voltametrie v Brittonově-Robinsonově pufru o pH = 2 na elektrodách obsahujících [EMIM][CF₃SO₃] bylo provedeno stejné stanovení ambroxolu s elektrodami obsahujícími [BMIM][PF₆]. Měření bylo prováděno na elektrodách CPE typ 2, CILE a IL/CPE s 50 a 25% obsahem RTILu v elektrodě. Potvrdila se stejná závislost jako u prvního použitého RTILu. Elektrody s vysokým obsahem RTILu, CILE a IL/CPE s 50% obsahem RTILu v elektrodě, vykazovaly vysoké proudové pozadí a nebylo možné nalézt pík analytu. Při porovnání výšek píků ambroxolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru o pH = 2 naměřených na elektrodách obsahujících [EMIM][CF₃SO₃] a [BMIM][PF₆], tab. 3.4.2.2, je vidět, že výšky píků rostou s rostoucím obsahem RTILu v elektrodě. Pík ale nelze detekovat při vyšším obsahu RTILu v elektrodě, protože se ztrácí ve vysokém proudovém pozadí elektrody, jak již bylo uvedeno.

Tab. 3.4.2.1 Porovnání výšek píků $K_3[Fe(CN)_6]$ ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) v závislosti na obsahu RTILu v elektrodě a typu základního elektrolytu a jeho koncentrace.

Obsah [BMIM][PF ₆] v elektrodě [%]	<i>I</i> [μA]		
	B-R pufr (pH = 2)	KCl (0,1 mol/l)	KCl (0,5 mol/l)
0	48,2	11,9	54,1
25	61,2	56,1	99,5
50	49,3	36,9	112,1
100	23,1	17,0	113,6

Tab. 3.4.2.2 Porovnání výšek píků ambroxolu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) v závislosti na obsahu a typu RTILu.

Obsah RTILu v elektrodě [%]	<i>I</i> [nA]	
	[EMIM][CF ₃ SO ₃]	[BMIM][PF ₆]
0	494,4	494,4
10	500,9	521,5
25	565,2	-
50	-	-
100	-	-

Porovnáním výsledků získaných na elektrodách obsahujících [EMIM][CF₃SO₃] a [BMIM][PF₆] a charakteru studovaných látek bylo zjištěno, že detekci stanovované látky by mohl znemožnit nebo naopak zlepšit náboj stanovované látky v roztoku, a to vzhledem k tomu, že $K_3[Fe(CN)_6]$ se v roztoku vyskytuje jako anion a ambroxol jako kation. K potvrzení vlivu náboje látky v roztoku na její stanovení i při vysokém obsahu RTILu v elektrodě byly vybrány další dvě standardní látky s kladným a záporným nábojem, které se dobře oxidují, a to síran železnatý a hydrochinon.

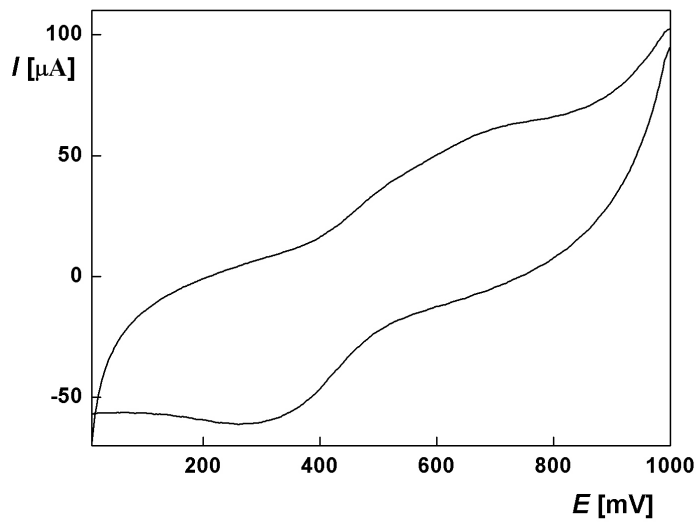
Byly proměřeny cyklické voltamogramy síranu železnatého o koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l v prostředí 0,5 mol/l KCl na elektrodách CPE typ 2, CILE a IL/CPE

s 50 a 25% obsahem RTILu v elektrodě. Projevila se stejná závislost vzrůstu výšky píku a zároveň i vzrůstu proudového pozadí stejně jako u předcházejících látek, viz obr. 3.4.2.5, 3.4.2.6, 3.4.2.7, 3.4.2.8, kde jsou uvedeny cyklické voltamogramy síranu železnatého.

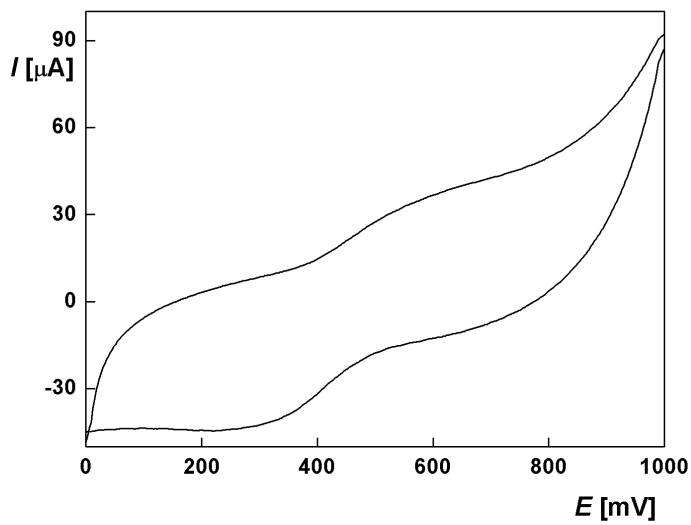
Stejně jako u hexakyanoželezitanu draselného byly u síranu železnatého o koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l proměřeny diferenční pulzní voltamogramy s elektrodami CPE typ 2, CILE a IL/CPE s 50 a 25% obsahem RTILu v elektrodě v 0,5 mol/l KCl jako základním elektrolytu. V tab. 3.4.2.3 jsou uvedeny výšky píků v závislosti na obsahu RTILu v elektrodě. Na rozdíl od předchozích látek bylo možné vyhodnotit i DP voltamogram naměřený na IL/CPE s 50% obsahem RTILu v elektrodě. Výška píku odečtená z toho voltamogramu byla ale nižší, než výška píku odečtená z voltamogramu naměřeného s IL/CPE s 25% obsahem RTILu, která stejně jako u předchozích látek poskytovala nejvyšší píky. Snížení výšky píku analytu odečtené z voltamogramu naměřeném na IL/CPE s 50% obsahem RTILu bylo pravděpodobně způsobeno nemožností přesného odečtení výšky v důsledku vysokého proudového pozadí elektrody. Pro CILE nebylo pík analytu možné nalézt.

Tab. 3.4.2.3 Porovnání výšek píků FeSO_4 ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) v závislosti na obsahu RTILu v elektrodě.

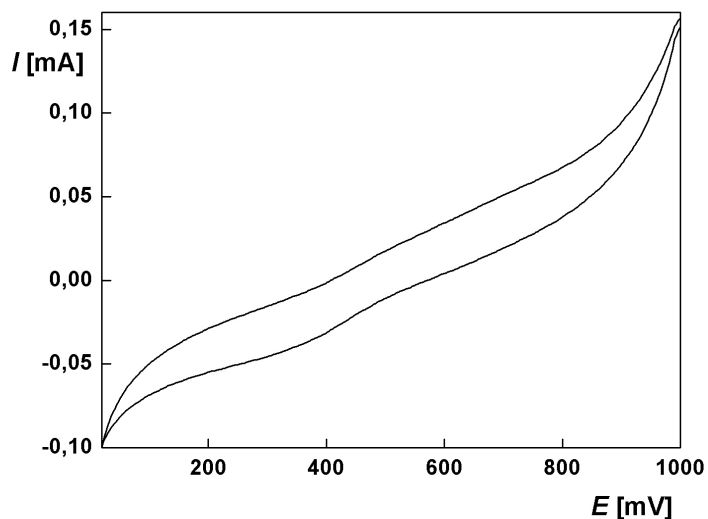
Obsah [BMIM][PF ₆] v elektrodě [%]	<i>I</i> [μA]
0	4,7
25	6,6
50	6,3
100	-



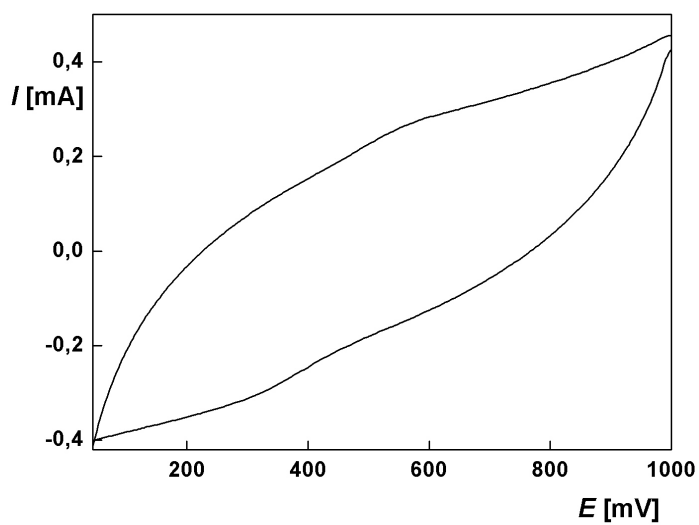
Obr. 3.4.2.5 Cyklický voltamogram FeSO_4 ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) měřený v prostředí 0,5 mol/l KCl na CPE typ 2.



Obr. 3.4.2.6 Cyklický voltamogram FeSO_4 ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) měřený v prostředí 0,5 mol/l KCl na IL/CPE s 25% obsahem RTILu v elektrodě.



Obr. 3.4.2.7 Cyklický voltamogram FeSO_4 ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) měřený v prostředí 0,5 mol/l KCl na IL/CPE s 50% obsahem RTILu v elektrodě.



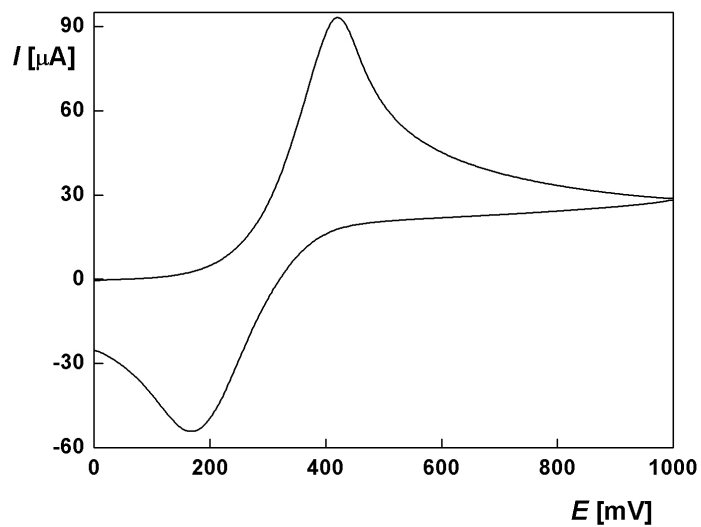
Obr. 3.4.2.8 Cyklický voltamogram FeSO_4 ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) měřený v prostředí 0,5 mol/l KCl na CILE.

Další studovanou látkou byl hydrochinon. Byly proměřeny cyklické voltamogramy a diferenční pulzní voltamogramy hydrochinonu o koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l v 0,5 mol/l KCl jako základním elektrolytu. Měření bylo prováděno s elektrodami CPE typ 2, CILE a IL/CPE s 50 a 25% obsahem RTILu v elektrodě. Na obr. 3.4.2.9, 3.4.2.10, 3.4.2.11, 3.4.2.12 jsou uvedeny cyklické voltamogramy hydrochinonu naměřené na výše uvedených typech elektrod. Z cyklických voltamogramů vyplývá opět stejný trend vzrůstu výšky píku s rostoucím obsahem RTILu v elektrodě a vzrůstu proudového pozadí elektrody.

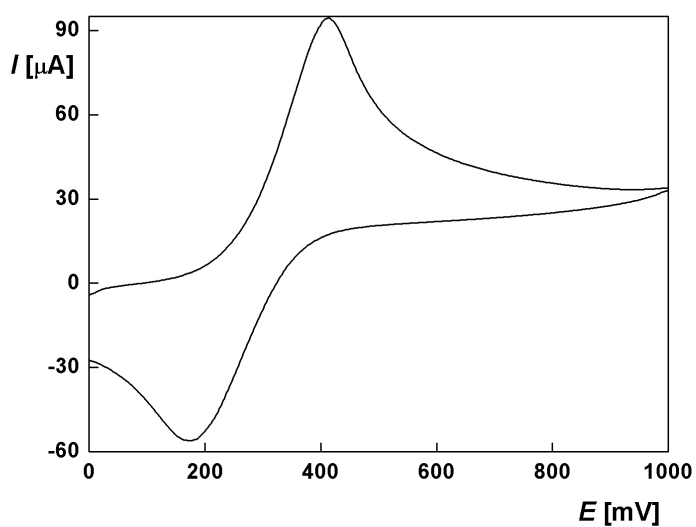
Tab. 3.4.2.4 uvádí výšky píků hydrochinonu naměřené diferenční pulzní voltametří v závislosti na obsahu RTILu v elektrodě. I zde se opět potvrdila podobná závislost jako u předchozích látek, kdy nejvyšší píky poskytovala IL/CPE s 25% obsahem RTILu v elektrodě. Rozdílem ale je možnost nalezení píku analytu i při vysokém obsahu RTILu v elektrodě, tedy i na IL/CPE s 50% obsahem RTILu v elektrodě a na CILE. Podobně jako u síranu železnatého byly výšky píků odečtené z voltamogramů naměřených na IL/CPE s 50% obsahem RTILu v elektrodě a na CILE nižší než výšky píků odečtené z voltamogramů naměřených na IL/CPE s 25% obsahem RTILu v elektrodě. Snížení výšky píku analytu odečtené z voltamogramu naměřeném na IL/CPE s 50% obsahem RTILu a na CILE bylo podobně jako u síranu železnatého pravděpodobně způsobeno nemožností přesného odečtení výšky v důsledku vysokého proudového pozadí elektrody.

Tab. 3.4.2.4 Porovnání výšek píků hydrochinonu ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) v 0,5 mol/l KCl v závislosti na obsahu RTILu v elektrodě.

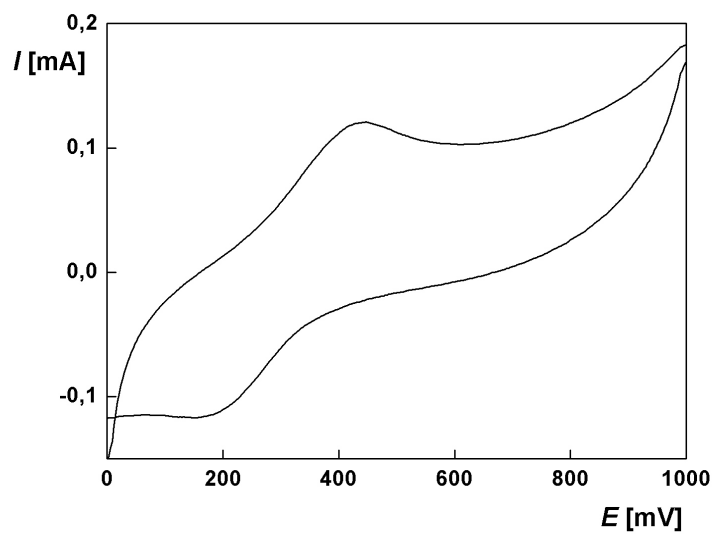
Obsah [BMIM][PF ₆] v elektrodě [%]	<i>I</i> [μA]
0	38,5
25	42,2
50	39,4
100	18,3



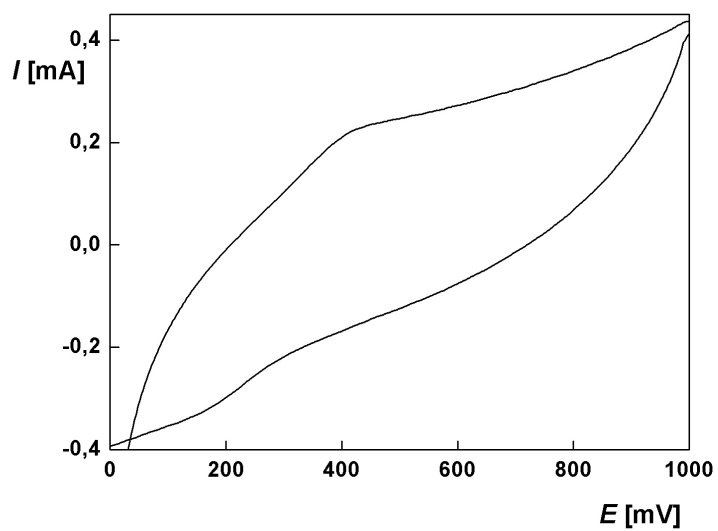
Obr. 3.4.2.9 Cyklický voltamogram hydrochinonu ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) měřený v prostředí 0,5 mol/l KCl na CPE typ 2.



Obr. 3.4.2.10 Cyklický voltamogram hydrochinonu ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) měřený v prostředí 0,5 mol/l KCl na IL/CPE s 25% obsahem RTILu v elektrodě.



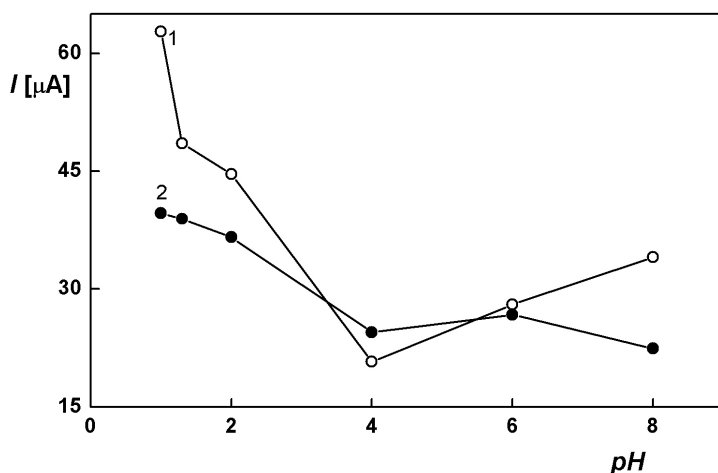
Obr. 3.4.2.11 Cyklický voltamogram hydrochinonu ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) měřený v prostředí 0,5 mol/l KCl na IL/CPE s 50% obsahem RTILu v elektrodě.



Obr. 3.4.2.12 Cyklický voltamogram hydrochinonu ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) měřený v prostředí 0,5 mol/l KCl na CILE.

Byl proměřen vliv pH Brittonova-Robinsonova pufru na výšku píku hydrochinonu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l metodou diferenční pulzní voltametrie na elektrodách CPE typ 2 a IL/CPE s 25% obsahem RTILu v elektrodě. Elektrody s vyšším obsahem RTILu, CILE a IL/CPE s 50% obsahem RTILu, nebyly použity z důvodu nižší poskytované odezvy. Byly porovnány výšky a tvary píků pro oba typy elektrod. Vzhledem k tomu, že píky byly při $\text{pH} = 2$ nejvyšší a nejsymetričtější, byl vyzkoušen vliv silně kyselého prostředí 0,05 mol/l a 0,1 mol/l kyseliny fosforečné. Vliv pH na výšku píku je uveden na obr. 3.4.2.13. Pro 0,05 mol/l kyseliny fosforečné bylo orientačně vypočteno $\text{pH} = 1,3$ a pro 0,1 mol/l kyseliny fosforečné $\text{pH} = 1$. Bylo zjištěno, že píky hydrochinonu jsou u obou typů elektrod v prostředí kyseliny fosforečné vyšší než v prostředí KCl nebo Brittonova-Robinsonova pufru. Ze získaných výsledků vyplývá, že nejlépe se hydrochinon chová v silně kyselém prostředí kyseliny fosforečné.

Za zjištěných optimálních podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti hydrochinonu v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ až $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Byla vyhodnocena a porovnána mez detekce na obou typech elektrod. Mez detekce byla stanovena jako množství analytu, poskytující signál, jehož výška je rovna trojnásobku směrodatné odchylky stanovení při nejnižší dosažené koncentraci. V tab. 3.4.2.5 a 3.4.2.6 jsou uvedeny parametry kalibračních závislostí hydrochinonu a vypočtené meze detekce. Na obr. 3.4.2.14 a 3.4.2.15 jsou uvedeny kalibrační závislosti pro koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ až $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l hydrochinonu. Experimentálně zjištěnými body kalibračních závislostí byly proloženy regresní přímky vyjma dvou bodů odpovídajících nejvyšším koncentracím analytu, tyto body jsou pravděpodobně mimo lineární dynamický rozsah použité metody. Korelační koeficienty jsou pro koncentrační rozmezí $6 \cdot 10^{-5}$ až $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l blízké jedné a závislost lze pokládat za lineární. Při detekci nízkých koncentrací hydrochinonu měla na stanovení nežádoucí vliv nečistota obsažená v grafitovém prášku. Z tohoto důvodu byly obě kalibrační závislosti naměřeny pouze do koncentrace hydrochinonu $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l, protože při nižších koncentracích nebylo možné látku stanovit s dostatečnou opakovatelností.



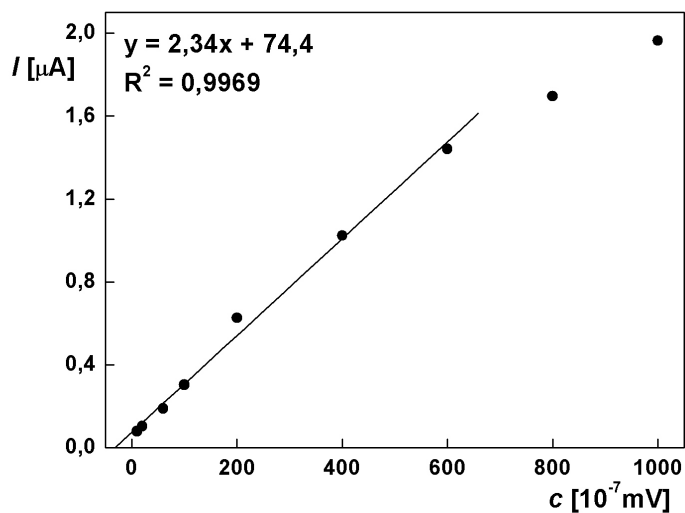
Obr. 3.4.2.13 Vliv pH B-R pufru (pH = 2, 4, 6, 8) a H₃PO₄ (pH = 1; 1,3) na výšku píku hydrochinonu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) měřené metodou DPV. (1) IL/CPE s 25% obsahem RTILu v elektrodě, (2) CPE typ 2.

Tab. 3.4.2.5 Parametry kalibračních závislostí hydrochinonu měřené metodou DPV na CPE typ 2.

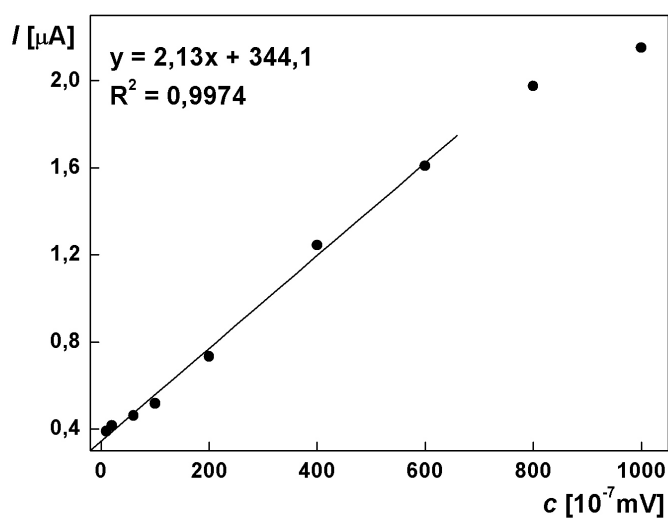
Koncentrační rozmezí [mol/l]	směrnice [10 ⁷ nA.l/mol]	úsek [nA]	R ²
6.10 ⁻⁵ – 1.10 ⁻⁵	2,21	130	0,9962
1.10 ⁻⁵ – 1.10 ⁻⁶	2,46	52	0,9976
6.10 ⁻⁵ – 1.10 ⁻⁶	2,34	74	0,9969
LOD = 6,8.10⁻⁶ mol/l			

Tab. 3.4.2.6 Parametry kalibračních závislostí hydrochinonu měřené metodou DPV na IL/CPE s 25% obsahem RTILu v elektrodě.

Koncentrační rozmezí [mol/l]	směrnice [10 ⁷ nA.l/mol]	úsek [nA]	R ²
6.10 ⁻⁵ – 1.10 ⁻⁵	2,13	344	0,9974
1.10 ⁻⁵ – 1.10 ⁻⁶	1,36	381	0,9968
6.10 ⁻⁵ – 1.10 ⁻⁶	2,22	304	0,9974
LOD = 9,0.10⁻⁶ mol/l			



Obr. 3.4.2.14 Kalibrační závislost hydrochinonu pro koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-6}$ mol/l, měřeno technikou DPV v prostředí 0,1 mol/l H_3PO_4 na CPE typ 2.



Obr. 3.4.2.15 Kalibrační závislost hydrochinonu pro koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-6}$ mol/l, měřeno technikou DPV v prostředí 0,1 mol/l H_3PO_4 na IL/CPE s 25% obsahem RTILu v elektrodě.

Získané výsledky stanovení hydrochinonu na CPE typ 2 a IL/CPE s 25% obsahem RTILu v elektrodě byly porovnány s článkem publikovaným autory z Číny Zhang a Zheng. [43] V publikaci popisují stanovení hydrochinonu pomocí diferenční pulzní voltametrie s rychlostí polarizace elektrody 20 mV/s, šířce pulzu 50 mV a výšce pulzu 50 mV na třech typech elektrod, CILE, IL/CPE a CPE, s 3 mm vnitřním průměrem. Pracovní elektrodu CILE připravovali smísením 1 g grafitového prášku a 0,5 ml RTILu. Jako RTIL použili 1-heptyl-3-methylimidazolium hexafluorofosfát ([HMIM][PF₆]). Při přípravě IL/CPE používali poměr minerální olej : RTIL, 1:1 (V/V) a před smícháním s práškem nechali olej a RTIL dispergovat v ultrazvuku po dobu 5 min. Jako základní elektrolyt autoři používali 0,1 mol/l fosfátový pufr o pH = 7. Mez detekce hydrochinonu stanovili jako množství analytu poskytující signál, jehož výška je rovna trojnásobku směrodatné odchylky na 4.10⁻⁶ mol/l na CILE.

Pro stanovení hydrochinonu popsané v této diplomové práci, viz str. 65, bylo využito stejné analytické metody a obdobných podmínek stanovení uváděných čínskými autory. Hydrochinon byl stanoven pomocí diferenční pulzní voltametrie s rychlostí polarizace elektrody 20 mV/s, šířce pulzu 80 mV a výšce pulzu 50 mV na CPE typ 2 a na IL/CPE s 25% obsahem RTILu v elektrodě, obě s 2 mm vnitřním průměrem. Pracovní elektroda CPE typ 2 byla připravována smísením 100 mg grafitového prášku a 50 μl minerálního oleje. Pro přípravu pracovní elektrody IL/CPE s 25% obsahem RTILu byl využit strukturně podobný RTIL, [BMIM][PF₆], jako RTIL používaný čínskými autory, liší se pouze v délce alkylového řetězce. Pracovní elektroda IL/CPE s 25% obsahem RTILu byla připravována smísením 100 mg grafitového prášku a 50 μl minerálního oleje a RTILu s poměrem, minerální olej : RTIL, 75:25 (V/V), bez smísení v ultrazvuku. Postup smísení RTILu s olejem v ultrazvuku byl také vyzkoušen, ale neměl žádný vliv na zlepšení vlastností elektrody. Jako základní elektrolyt byla použita 0,1 mol/l kyselina fosforečná. Mez detekce stanovení hydrochinonu byla stanovena jako množství analytu poskytující signál, jehož výška je rovna trojnásobku směrodatné odchylky stanovení při nejnižší dosažené koncentraci na 6,8.10⁻⁶ mol/l na CPE typ 2 a na 9,0.10⁻⁶ mol/l na IL/CPE s 25% obsahem RTILu v elektrodě.

Autoři získali pro koncentraci hydrochinonu $1,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l odezvu cca $3,5 \mu\text{A}$ na CILE s 3 mm vnitřním průměrem. Oproti tomu vyvinuté IL/CPE s 25% obsahem RTILu v elektrodě s 2 mm vnitřním průměrem poskytovaly odezvu cca $2 \mu\text{A}$ pro koncentraci hydrochinonu $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Při porovnání získaných dat s daty uvedenými v článku lze říci, že vyvinuté IL/CPE mohou konkurovat elektrodám uváděným v článku i s menším obsahem RTILu v elektrodě. Při použití naprosto čistého grafitového prášku zbaveného veškerých nečistot by bylo pravděpodobně možné snížit i mez detekce hydrochinonu.

3.5 Stanovení ambroxolu v komerčních přípravcích

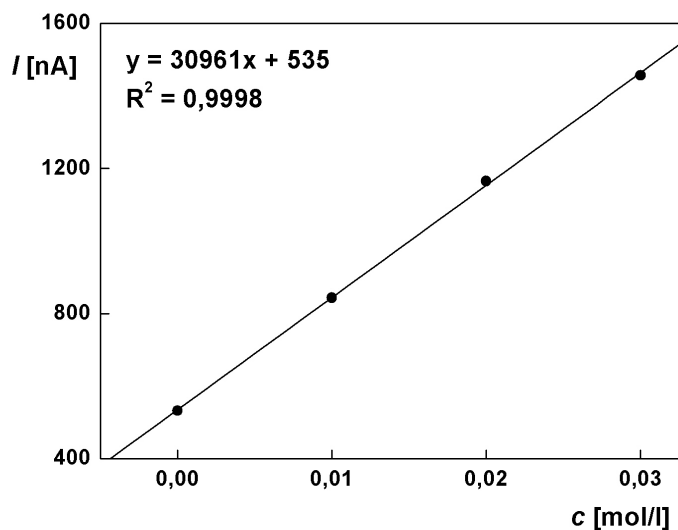
Ambroxol byl stanoven metodou standardního přídatku v komerčních přípravcích Mucosolvan a Ambrobene, hodnoty obsahu ambroxolu deklarované výrobcem byly u obou přípravků 7,5 mg/ml.

Oproti původním předpokladům bylo stanovení provedeno pouze na CPE typ 1. Důvodem byla nemožnost využití CILE popř. IL/CPE ke stanovení nízkých koncentrací ambroxolu. Přesto bylo stanovení na CPE typ 1 přesné (relativní směrodatná odchylka stanovení se pohybovala cca kolem 2 %) a získaná vypočtená množství ambroxolu v přípravcích se dobře shodovala s deklarovanou hodnotou uváděnou výrobcem.

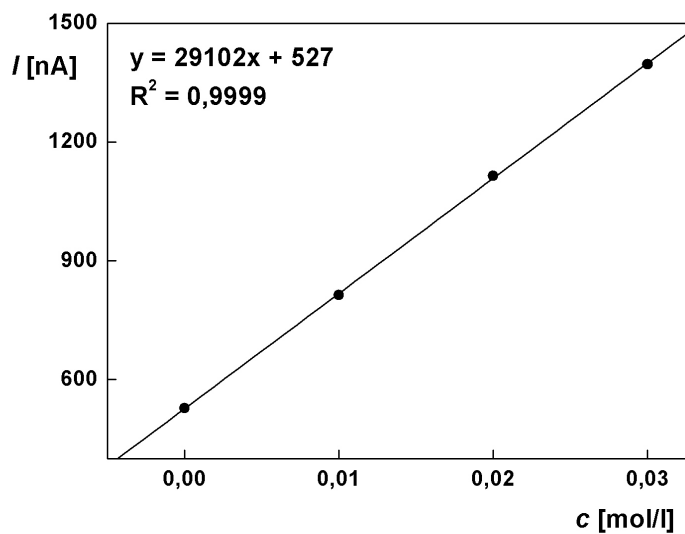
V tab. 3.5.1 jsou uvedeny vypočtené hodnoty obsahu ambroxolu v přípravcích a příslušné statistické výpočty. Na obr. 3.5.1 je uvedena kalibrační závislost měřená metodou standardního přídatku pro stanovení ambroxolu v Mucosolvanu. Na obr. 3.5.2 je uvedena kalibrační závislost měřená metodou standardního přídatku pro stanovení ambroxolu v Ambrobene. Na obr. 3.5.3 a 3.5.4 jsou znázorněny voltamogramy stanovení obsahu ambroxolu metodou standardního přídatku v Mucosolvanu a v Ambrobene.

Tab. 3.5.1 Vypočtené hodnoty obsahu ambroxolu v komerčních přípravcích a statistické vyhodnocení stanovení.

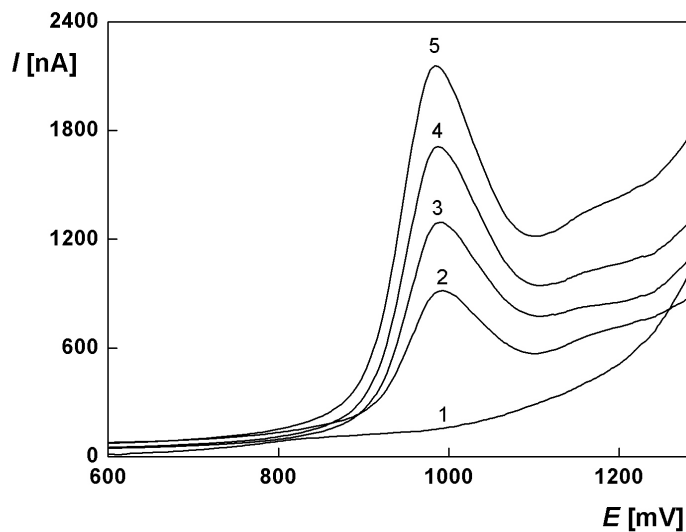
	Mucosolvan	Ambrobene
obsah ambroxolu [mg/ml]	7,09	7,55
<i>s</i> [mg/ml]	0,11	0,12
<i>s_r</i> [%]	1,53	1,62
<i>L_{1,2}</i>	0,24	0,27
výtěžek [%]	94,56	100,60



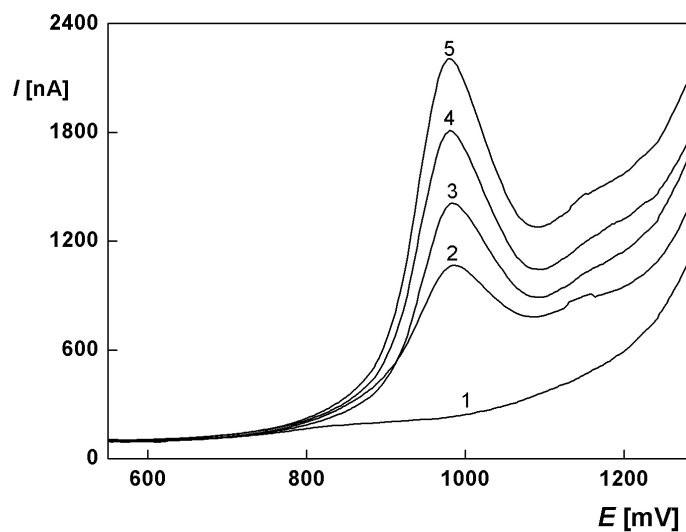
Obr. 3.5.1 Kalibrační závislost stanovení obsahu ambroxolu v Mucosolvanu metodou standardního přídatku měřená metodou DPV v prostředí B-R pufru o pH = 2 na CPE typ 1.



Obr. 3.5.2 Kalibrační závislost stanovení obsahu ambroxolu v Ambrobene metodou standardního přídatku měřená metodou DPV v prostředí B-R pufru o pH = 2 na CPE typ 1.



Obr. 3.5.3 DP voltamogramy stanovení obsahu ambroxolu v Mucosolvanu metodou standardního přídatku měřené na CPE typ 1 v prostředí B-R pufru o pH = 2. (1) základní elektrolyt, (2) vzorek bez přídatku (3) vzorek + první standardní přídavek, (4) vzorek + druhý standardní přídavek, (5) vzorek + třetí standardní přídavek.



Obr. 3.5.4 DP voltamogramy stanovení obsahu ambroxolu v Ambrobene metodou standardního přídatku měřené na CPE typ 1 v prostředí B-R pufru o pH = 2. (1) základní elektrolyt, (2) vzorek bez přídatku (3) vzorek + první standardní přídavek, (4) vzorek + druhý standardní přídavek, (5) vzorek + třetí standardní přídavek.

4. Závěr

Bylo prostudováno voltametrické chování ambroxolu metodou diferenční pulzní voltametrie v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru o různém pH a nalezeny optimální podmínky stanovení ambroxolu na GCPE a CPE typ 1: jako optimální pH Brittonova-Robinsonova pufru bylo stanoveno $\text{pH} = 2$. Za optimálních podmínek byly změřeny kalibrační závislosti a stanoveny meze detekce ambroxolu na GCPE a CPE typ 1, viz tab. 4.1.

Tab. 4.1 Meze detekce stanovené na GCPE a CPE typ 1.

<i>LOD</i> [mol/l] GCPE	<i>LOD</i> [mol/l] CPE typ 1
$2,5 \cdot 10^{-6}$	$2,0 \cdot 10^{-6}$

Byla prostudována možnost akumulace ambroxolu na GCPE. Látka se akumulovala pouze nevýrazně. Dosažená mez detekce $1,3 \cdot 10^{-6}$ mol/l nebyla výrazně nižší než meze detekce dosažené bez akumulace látky.

Následný výzkum uhlíkových pastových elektrod obsahujících RTIL, CILE a IL/CPE za použití dvou typů RTILů, [EMIM][CF₃SO₃] a [BMIM][PF₆], nepřinesl předpokládané výsledky, tedy zvýšení citlivosti elektrody a snížení meze detekce ambroxolu metodou diferenční pulzní voltametrie.

Použitím standardních látek, jako byl hexakyanoželezitan draselný, kyselina askorbová, síran železnatý a hydrochinon, byly studovány vlastnosti CILE, IL/CPE a bylo zjištěno, že elektrody jsou sice několikrát citlivější než klasické CPE, ale jejich nevýhodou je vysoké proudové pozadí ve srovnání s proudovým pozadím klasické CPE. Vysvětlení tohoto jevu je, že vysoký nabíjecí proud maskuje faradaický proud, a proto není možné nalézt pík studované látky, zvláště při nižších koncentracích. Bylo zjištěno, že nabíjecí proud je tím vyšší, čím vyšší je obsah RTILu v elektrodě. Publikované práce, které stanovují různé typy látek (katechol, hydrochinon, K₃[Fe(CN)₆], kyselina askorbová, paracetamol a další), tento jev potvrzují, většina publikovaných prací uvádí meze detekce cca $4 \cdot 10^{-6}$ až $8 \cdot 10^{-6}$ mol/l.

Vyvinutá elektroda pro stanovení hydrochinonu obsahovala 25 % RTILu a byla připravena z grafitového prášku (IL/CPE), dosažená mez detekce byla $9,0 \cdot 10^{-6}$ mol/l.

Byl stanoven obsah ambroxolu v komerčních přípravcích Mucosolvan a Ambrobene metodou standardního přídávku. Stanovení bylo prováděno metodou diferenční pulzní voltametrie na CPE typ 1, za zjištěných optimálních podmínek stanovení ambroxolu. Obsah ambroxolu v Mucosolvanu byl stanoven na $7,09 \pm 0,24$ mg/ml a v Ambrobene na $7,55 \pm 0,27$ mg/ml. Hodnoty obsahu ambroxolu deklarované výrobcem byly u obou přípravků 7,5 mg/ml.

5. Literatura

1. Státní ústav pro kontrolu léčiv [on-line]. Dostupné z URL : <http://www.sukl.cz>, [cit.17.11.2006].
2. Český lékopis 2005 – Doplněk 2006, elektronická verze [CD-ROM].
3. Sigma – Aldrich [on/line]. Dostupné z URL : <http://www.sigma-aldrich.com>, [cit.13.11.2006].
4. Demircigil, BT.; Uslu, B.; Ozkan, Y.; Senturk, Z.: Voltammetric oxidation of ambroxol and application to its determination in pharmaceuticals and in drug dissolution studies. *Electroanalysis* **15**, 230–234 (2003).
5. Habib IHI.; Zayed SIM.: Adsorptive stripping voltammetric determination of ambroxol. *Pharmazie* **60**, 193–196 (2005).
6. Jin, GD.; Hu, XY.; Leng, ZZ.; Yao, C.: Anodic voltammetric behaviour of ambroxol at the carbon paste electrode. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **30**, 214–217 (2002). CA **136**:406999.
7. Bazylak, G.; Nagels, LJ.: Simultaneous high-throughout determination of clenbuterol, ambroxol and bromhexine in pharmaceutical formulations by HPLC with potentiometric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **32**, 887–903 (2003).
8. Dincer Z.; Basan H.; Göger Günden N.: Quantitative determination of ambroxol in tablets by derivative UV spectrophotometric method and HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **31**, 867–872 (2003).

9. Heinänen M.; Barbas C.: Validation of an HPLC method for the quantification of ambroxol hydrochloride and benzoic acid in syrup as pharmaceutical form stress test for stability evaluation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **24**, 1005–1010 (2001).
10. Indrayanto G.; Handayani R.: Quantitative determination of ambroxol hydrochloride in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **11**, 781–784 (1993).
11. Koundourellis, JE.; Malliou, ET.; Broussali, TA.: High performance liquid chromatographic determination of ambroxol in the presence of different preservatives in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **23**, 469–475 (2000).
12. Qi, ML.; Wang, P.; Cong, RH.; Yang, JJ.: Simultaneous determination of roxithromycin and ambroxol hydrochloride in a new tablet formulation by liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **35**, 1287–1291 (2004).
13. Zarzuelo, A.; Sayalero, ML.; Lopez, FG.; Lanao, JM.: Determination of ambroxol hydrochloride by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **24**, 1007–1014 (2001).
14. Kim, H.; Yoo, JY.; Han, SB.; Lee, HJ.; Lee, KR.: Determination of ambroxol in human plasma using LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **32**, 209–216 (2003).
15. Su, F.; Wang, F.; Gao, W.; Li, H.: Determination of ambroxol in human plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **853**, 364–369 (2007).

16. Abdel-Ghani, N. T.; Hussein S. H.: Determination of ambroxol hydrochloride in pure solutions and some of its pharmaceutical preparations under batch and FIA conditions. *IL Farmaco* **58**, 581–589 (2003).
17. Benli, P.; Tuncel, Muzaffer.: Flow-injection analysis of amroxol in pharmaceutical tablets. *Pharmazie* **53**, 203–204 (1998).
18. Satinsky, D.; Dos Santos, LML.; Sklenarova, H.; Solich, P.; Montenegro, MCBSM.; Araujo, AN.: Sequential injection chromatographic determination of ambroxol hydrochloride and doxycycline in pharmaceutical preparations. *Talanta* **68**, 214–218 (2005).
19. Satinsky, D.; Huclova, J.; Ferreira, RLC.; Montenegro, MCBSM.; Solich, P.: Determination of ambroxol hydrochloride, methylparaben and benzoic acid in pharmaceutical preparations based on sequential injection technique coupled with monolithic column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **40**, 287–293 (2006).
20. Perez-Ruiz, T.; Martinez-Lozano, C.; Sanz, A.; Bravo, E.: Determination of bromhexine and ambroxol in pharmaceutical dosage forms, urine and blood serum. *Journal of Chromatography B* **692**, 199–205 (1997).
21. Perez-Ruiz, T.; Martinez-Lozano, C.; Sanz, A.; Bravo, E.: Sensitive method for the determination of ambroxol in body fluids capillary electrophoresis and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science* **742**, 205–210 (2000).
22. Pospisilova, M.; Polasek, M.; Jokl, V.: Determination of ambroxol of bromhexine in pharmaceuticals by capillary isotachopheresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **24**, 421–428 (2001).

23. Hwang, MS.; Cho, S.; Chung, H.; Woo, YA.: Nondestructive determination of ambroxol content in tablets by Raman spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **38**, 210–215 (2005).
24. Szostak R.; Mazurek S.: FT-Raman quantitative determination of ambroxol in tablets. *Journal of Molecular Structure* **704**, 229–233 (2004).
25. Švancara, I.; Vytřas, K.; Barek, J.; Zima, J.: Carbon Paste Electrodes in Modern Electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **31**, 311-345 (2001).
26. Švancara, I.; Vytřas, K.: Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod. *Chemické Listy* **88**, 138–146 (1994).
27. Vytřas, K.; Švancara, I.: Aplikace uhlíkových pastových elektrod v elektroanalýze. *Chemické Listy* **88**, 412–422 (1994).
28. Bonhote, P.: Hydrophobic, Highly conductive ambient-temperature molten salts. *Inorg. Chem.* **35**, 1168–1178 (1996).
29. Mizuuchi, H.; Jaitely, V.; Murdan, S.; Florence, A.T.: Room temperature ionic liquids and their mixtures: Potential pharmaceutical solvents. *European journal of pharmaceutical science* **33**, 326–331 (2008).
30. Carda-Broch, S.; Berthod, A.; Armstrong, D. W.: Solvent properties of the 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid. *Anal. Bioanal. Chem.* **375**, 191–199 (2003).
31. Koel, M.: Ionic liquids in chemical analysis. *Critical Reviews in Analytical chemistry* **35**, 177–192 (2005).

32. Wilkes, John S.: A short history of ionic liquids-from molten salts to neoteric solvents. *Green Chemistry* **4**, 73–80 (2002).
33. Huddleston, J.: Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic RTIL incorporating the imidazolium cation. *Green Chemistry* **3**, 156–164 (2001).
34. Kachosangi, R. T.: RTIL carbon nanotube paste electrodes. *Electroanalysis* **19**, 1483–1489 (2007).
35. Seddon, K.: Influence of chloride, water and organic solvents on the physical properties of IL. *Pure Appl. Chem.* **12**, 2275–2287 (2000).
36. Maleki, N.: High-performance carbon composite electrode based on an IL as a binder. *Analytical Chemistry* **11**, 3820–3826 (2006).
37. Sun, W.: Electrochemistry and electrocatalysis of Nafion/Nano-CaCO₃/Hb film modified carbon IL electrode using [BMIM][PF₆] as binder. *Electroanalysis* **19**, 1368–1374 (2007).
38. Wang, S. F.: Design of carbon paste biosensors based on the mixture of IL and paraffin oil as a binder for high performance and stabilization. *Electrochemistry Communications* **9**, 807–812 (2007).
39. Liu, H.: An IL-type CPE and its polyoxometalate-modified properties. *Electrochemistry Communications*, **7**, 1357–1363 (2005).
40. Sun, W.: Electrochemistry and electrocatalysis of Nafion/Nano film modified carbon IL electrode using [BMIM][PF₆] as binder. *Electroanalysis* **19**, 1368–1374 (2007).

41. Sun, W.: Application of carbon ionic liquid electrode for the electrooxidative determination of catechol. *Sensors and Actuators B* **133**, 387–392 (2008).
42. Xiaodong, S.; Hogfang, Z.; Jianbin, Z.: Electrochemical behaviour and differential pulse voltammetric determination of paracetamol at carbon ionic liquid electrode. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 1049–1055 (2008).
43. Zhang, Y.; Zheng, J.B.: Comparative investigation on electrochemical behaviour of hydroquinone at carbon ionic liquid electrode and carbon paste electrode. *Electrochimica Acta* **52**, 7210–7216 (2007).