

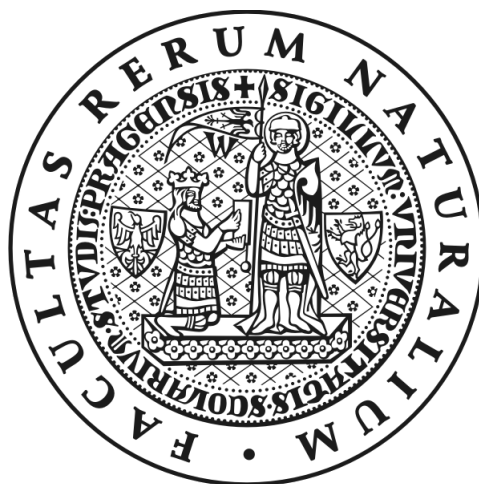
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Lucie Škvorová

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ VYBRANÝCH  
NITROIMIDAZOLOVÝCH LÉČIV

Voltammetric Determination of Selected Nitroimidazole Drugs

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Praha 2012

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857. Z tohoto výzkumného záměru byla také spolufinancována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a dále finančně podpořena Univerzitou Karlovou v Praze (projekt UNCE 2012/44 centrum supramolekulární chemie).

## Prohlášení

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

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

V Praze dne 18. května 2012

## Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za profesionální vedení, cenné připomínky k mé práci, vřelý a trpělivý přístup. Dále bych ráda vyjádřila dík všem členům Katedry analytické chemie PřF UK za pomoc v mnoha ohledech a vytvoření kolegiální atmosféry.

V neposlední řadě si poděkování zaslouží i mí rodiče, že mi umožnili studium na vysoké škole, a přátelé za podporu.

## Abstrakt

Předmětem předkládané diplomové práce bylo studium elektrochemického chování nitroimidazolových léčiv metronidazolu a ornidazolu a nalezení optimálních podmínek pro jejich voltametrické stanovení na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrodě (m-AgSAE) pomocí technik DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV). Voltametrické chování vybraných léčiv bylo studováno v závislosti na pH prostředí (realizováno užitím Brittonova-Robinsonova pufru (BR pufru)) a pomocí cyklické voltametrie (CV) byl studován mechanismus redukce obou léčiv.

Jako optimální prostředí pro voltametrická stanovení studovaných nitroimidazolových léčiv na m-AgSAE v katodické oblasti potenciálů bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 8,0, ve kterém byly dále proměřeny koncentrační závislosti v rozmezí od  $2 \cdot 10^{-7}$  do  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L. Dosažené meze stanovitelnosti ( $L_Q$ ) metronidazolu i ornidazolu byly pro DCV i DPV na m-AgSAE řádově  $10^{-7}$  mol/L.

Aplikovatelnost nově vyvinutých voltametrických metod pro stanovení metronidazolu a ornidazolu byla ověřena na modelových vzorcích pitné a říční vody s dosaženými  $L_Q \approx 2 \cdot 10^{-7}$  mol/L pro DC voltametrii i diferenční pulzní voltametrii.

Nově vyvinuté voltametrické metody byly použity i pro stanovení obsahu metronidazolu v daných léčivech: Efloran – infuzní roztok 500 mg/100 mL (KRKA, Slovinsko), Entizol 500 mg – vaginální tablety (Polpharma, Polsko), Entizol 250 mg – tablety (Polpharma, Polsko).

Pro porovnání vyvinutých voltametrických metod s jinou analytickou metodou bylo proměřeno koncentrační rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L vybraných léčiv pomocí UV-VIS absorpční spektrofotometrie v deionizované vodě s dosaženou  $L_Q \approx 2 \cdot 10^{-7}$  mol/L pro metronidazol a pro ornidazol  $L_Q \approx 3 \cdot 10^{-7}$  mol/L. Z tohoto plyne, že  $L_Q$  pro vybrané látky dosažené metodou DCV na m-AgSAE, DPV na m-AgSAE a pomocí UV-VIS absorpční spektrofotometrie jsou za daných podmínek srovnatelné.

## Abstract

The aim of presented Diploma Thesis was to study an electrochemical behavior of nitroimidazole drugs metronidazole and ornidazole and to find optimal conditions for their voltammetric determination at a mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode using DC voltammetry (DCV) and differential pulse voltammetry (DPV). Voltammetric behavior of selected drugs was investigated in dependence on the pH of the medium used (realized using a Britton-Robinson buffer (BR buffer)) and a mechanism of the reduction of both drugs was investigated using cyclic voltammetry (CV).

The optimum medium for voltammetric determination of studied nitroimidazole drugs at the m-AgSAE in a region of cathodic potentials was found to be the BR buffer of pH 8.0. Then, the concentration dependences were measured in this optimum medium in the concentration range from  $2 \cdot 10^{-7}$  mol/L to  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L. The limits of quantification ( $L_Q$ s) for both metronidazole and ornidazole were found in the concentration order of  $10^{-7}$  mol/L by using DCV and DPV at the m-AgSAE.

The applicability of the newly developed voltammetric methods of the determination of nitroimidazole drugs was verified on the model samples of drinking and river water, with  $L_Q \approx 2 \cdot 10^{-7}$  mol/L for both DC voltammetry and differential pulse voltammetry at the m-AgSAE.

The newly developed voltammetric methods were also used for the determination of the metronidazole content in selected drugs: Efloran – infusion 500 mg/100 mL (KRKA, Slovenia), Entizol 500 mg – vaginal tablets (Polpharma, Poland), Entizol 250 mg – tablets (Polpharma, Poland).

For a comparison of the developed voltammetric methods with supplemental analytical method, the concentration range  $2 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L of selected drugs was measured using UV-VIS absorption spectrophotometry in deionized water, with reached  $L_Q \approx 2 \cdot 10^{-7}$  mol/L for metronidazole and  $L_Q \approx 3 \cdot 10^{-7}$  mol/L for ornidazole. Hence it follows that the  $L_Q$ s for selected drugs reached using DCV at m-AgSAE, DPV at m-AgSAE, and UV-VIS absorption spectrophotometry are comparable under given conditions.

## **Předmětová hesla**

Analytická chemie

Elektrochemie

Nitroimidazolové deriváty

Voltametrie

## **Klíčová slova**

Metronidazol, Ornidazol

DC voltametrie

Diferenční pulzní voltametrie

Cyklická voltametrie

Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda

Modelové vzorky pitné a říční vody

Stanovení metronidazolu v lékových formách

UV-VIS absorpční spektrofotometrie

---

## **Subject Heading**

Analytical Chemistry

Electrochemistry

Nitroimidazol Derivatives

Voltammetry

## **Key Words**

Metronidazole, Ornidazole

DC Voltammetry

Differential Pulse Voltammetry

Cyclic voltammetry

Mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode

Model Samples of Drinking and River Water

Determination of Metronidazole in Pharmaceutical Preparations

UV-VIS Absorption Spectrophotometry

## Seznam použitých zkratek

<i>A</i>	absorbance
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
<i>c</i>	molární koncentrace [mol/L]
C.A.S.	Chemical Abstract Service
CV	Cyklická voltametrie
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DCV	DC voltametrie
DPV	Diferenční pulzní voltametrie
<i>E</i>	potenciál [mV]
<i>E<sub>p</sub></i>	potenciál píku látky [mV]
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<i>I</i>	elektrický proud [nA]
<i>I<sub>p</sub></i>	elektrický proud píku látky [nA]
<i>L<sub>1,2</sub></i>	interval spolehlivosti
<i>L<sub>Q</sub></i>	mez stanovitelnosti [mol/L]
<i>m</i>	hmotnost metronidazolu v léčivých preparátech [mg]
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda
MS	hmotnostní spektrometrie
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
pH	pH Brittonova-Robinsonova pufru
<i>R</i>	korelační koeficient
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
<i>s</i>	směrodatná odchylka
<i>s<sub>r</sub></i>	relativní směrodatná odchylka
<i>v</i>	rychlost nárůstu potenciálu [mV/s]
$\tilde{x}$	medián
<i>w</i>	hmotnostní zlomek [%]
ZE	základní elektrolyt
$\lambda$	vlnová délka [nm]

# Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>10</b>
1.1 Cíl práce .....	10
1.2 Nitroimidazolové deriváty .....	10
1.2.1 Metronidazol .....	11
1.2.2 Ornidazol .....	12
1.3 Elektrochemické metody .....	13
1.4 Separační metody .....	14
1.5 Spektrální metody .....	15
<b>2. Experimentální část .....</b>	<b>16</b>
2.1 Reagencie .....	16
2.2 Aparatura.....	16
2.3 Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda .....	17
2.4 Pracovní postupy .....	18
2.4.1 Předúprava elektrody.....	18
2.4.2 Voltametrie .....	19
2.4.3 Spektrofotometrie.....	20
2.4.4 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení dat .....	21
<b>3. DC voltametrie a diferenční pulzní voltametrie .....</b>	<b>24</b>
3.1 Metronidazol .....	24
3.1.1 Vliv pH.....	24
3.1.2 Vliv regenerace na m-AgSAE .....	25
3.1.3 Kalibrační závislost .....	27
3.2 Ornidazol.....	31
3.2.1 Vliv pH.....	31
3.2.2 Opakovatelnost měření.....	32
3.2.3 Kalibrační závislost .....	34
3.3 Aplikace DC voltametrie a DP voltametrie na modelových vzorcích pitné a říční vody .....	37
3.3.1 Metronidazol .....	37
3.3.2 Ornidazol .....	42
3.4 Voltametrické stanovení obsahu metronidazolu v léčivech .....	47
3.4.1 Metoda kalibrační přímky .....	47
3.4.2 Metoda standardního přídatku .....	51
<b>4. Cyklická voltametrie.....</b>	<b>54</b>
4.1 Metronidazol .....	54
4.2 Ornidazol.....	57
<b>5. UV-VIS spektrofotometrické stanovení metronidazolu a ornidazolu .....</b>	<b>60</b>
5.1 Metronidazol .....	61



5.2	Ornidazol.....	62
5.3	Srovnávací metoda UV-VIS absorpční spektrofotometrie pro stanovení obsahu metronidazolu v léčivech .....	64
<b>6.</b>	<b>Závěr a shrnutí dosažených výsledků .....</b>	<b>66</b>
<b>7.</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>68</b>

# 1. Úvod

## 1.1 Cíl práce

Předložená diplomová práce tvoří součást projektu řešeného na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, který se zabývá studiem elektrochemického chování vybraných nitroimidazolových léčiv.

Cílem této práce je nalezení optimálních podmínek pro voltametrické stanovení protinádorových léčiv v pufovaném vodném prostředí pomocí technik DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrodě (m-AgSAE) se záměrem dosáhnout co nejnižší meze stanovitelnosti ( $L_Q$ ). Dalším cílem bylo vybraná léčiva stanovit v reálných vzorcích a léčivech a také stanovit mechanismus redukce pro obě látky pomocí cyklické voltametrie (CV). Dále pak přispět k rozšíření elektroanalytických metod, které jsou v současné době málo využívány a nahrazovány metodami spektrofotometrickými nebo separačními (vysokoúčinná kapalinová chromatografie).

## 1.2 Nitroimidazolové deriváty

První přírodní nitrosloučeniny obsahující imidazol byly izolovány v roce 1953 a teprve o 12 let později byly syntetizovány. Imidazolová struktura byla studována pro farmakologické vlastnosti na azomycinu (2-nitro 1-H imidazolu) a bylo zjištěno, že tato látka vykazuje antibakteriální účinky. Ačkoli byla nitrace imidazolů známá od r. 1892, přihláška pro patent těchto syntetizovaných látek byla podána v r. 1957. Vývoj 4 a 5 nitroimidazolů, kam patří metronidazol a ornidazol byl největší v letech 1970-1975.<sup>1</sup>

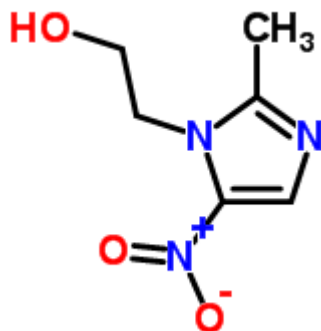
5-nitroimidazolové deriváty patří do antiprotozoálních a antimikrobiálních léčiv. Tyto vlastnosti jsou spojeny s redukcí nitro skupiny.<sup>2,3</sup> V posledních 10-ti letech se zkoumaly u těchto látek vlastnosti antibiotické a chemoterapeutické. Biologická aktivita 5-nitroimidazolů závisí na redukcí nitro skupiny za vzniku aktivního intermediátu, který působí na DNA anaerobních mikroorganismů a může způsobit ztrátu spirálové struktury. Dochází k inhibici syntézy nukleových kyselin, zastavuje se dělení buněk a dochází k buněčné smrti.<sup>4-6</sup>

Mimo jiné své využití našly i ve veterinární medicíně, díky antibiotickým

a antikocidiální vlastnostem. Dříve se používaly i jako doplňkové látky pro podporu růstu a zlepšení účinnosti krmiv.<sup>7</sup>

### 1.2.1 Metronidazol

Vzorec<sup>8</sup>:



Vlastnosti: Bílý nebo nažloutlý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, v acetonu, v ethanolu 96 % a v dichlormethanu, velmi těžce rozpustný v etheru.<sup>9</sup>

Metronidazol je vysoce účinný proti grampozitivním anaerobním bakteriím (*Clostridium difficile*) a gramnegativním anaerobním bakteriím (*Bacteroides fragilis*). Má antiprotozoální účinky, působí proti *Trichomonas Vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*.<sup>10</sup> Pro *Trichomonas Vaginalis* byly léčbou metronidazolem poprvé zaznamenány pozitivní účinky léčby. Mimo jiné působí proti gastritidě, dvanáctníkovým vředům, Crohnově chorobě, používá se i při lokální aplikaci proti růžovce, nebo ve formě gelu v zubním lékařství.<sup>11</sup>

Mnoho lékařů považuje metronidazol za tzv. „zlatý standard“ se kterým by se měla srovnávat jiná antibiotika s obdobnými vlastnostmi.

Metronidazol postrádá jakoukoli aktivitu proti aerobním bakteriím. Lze ho použít pouze v kombinaci s jinými látkami jako jsou např. aminoglykosidy.<sup>12</sup>

Redukovaná nitro skupina metronidazolu způsobuje účinnost proti anaerobním mikroorganismům. Metabolismem anaerobních organismů vzniká pyruvát, který se přemění na acetylkoenzym A (acetyl-Co-A). Tuto reakci katalyzuje pyruvát-ferredoxin oxidoreduktasa. Tento enzym může pomocí systému ferredoxinu přenést elektrony a metronidazol zredukovat. Dalším enzymem, který katalyzuje redukci metronidazolu je nitroreduktasa.<sup>13</sup>

Metronidazol podaný perorálně se vstřebává téměř úplně s biologickou dostupností

větší 90%. Přítomnost léčiva v plazmě se objeví do 2 hodin po podání. V menším množství jsou v plazmě i jeho aktivní metabolity. Vazba na proteiny je nízká, méně než 20 % metronidazolu se naváže na bílkoviny v plazmě. Distribuce je široká, do většiny tělesných tkání a tekutin, například v mozkomíšním moku a slinách je obdobná koncentrace látky jako v plazmě. Naopak nižších koncentrací dosahuje v placentární tkáni.<sup>14</sup>

Metabolizuje se v játrech na 5 metabolitů. Mezi hlavní patří hydroxy metabolit (1 hydroxyethyl-2 hydroxymethyl-5-nitroimidazol),<sup>15</sup> který má biologickou aktivitu 30-65 % a delší poločas eliminace než metronidazol. Hlavní cestou eliminace metronidazolu a jeho metabolitů je moč a stolice. Méně než 12 % metronidazolu je vyloučeno močí v nezměněné formě.<sup>14</sup>

### 1.2.2 Ornidazol



Vzorec:<sup>8</sup>

Vlastnosti: Bílý až nažloutlý krystalický prášek, na světle je nestálý. Je těžce rozpustný ve vodě a snadno rozpustný v ethanolu 96 %.<sup>9</sup>

Ornidazol má heterocyklickou strukturu složenou s nitroimidazolového jádra, na které je navázána 2-hydroxy-3 chloropropyllová skupina v poloze 1 a v poloze 2 je methylová skupina.

Vykazuje antibakteriální a antiprotozoální účinky. Používá se k léčbě anaerobních infekcí jako jsou bakteriální vaginóza, amébová úplavice, jaterní abscesy, ostatní prvokové infekce Giardiasis nebo Trichomóza.<sup>16</sup> Při užívání ornidazol ovlivňuje jiné skupiny léků, např. krevní ředidla (kumariny) nebo léčiva k uvolnění svalů.<sup>17</sup> Mimo jiné toto léčivo vykazovalo při studii na potkanech i antikoncepční účinky.<sup>18, 19</sup>

Po perorálním podání se ornidazol snadno absorbuje z gastrointersticiálního traktu a maximální plazmatické koncentrace je dosaženo během 2 hodin po jednorázové dávce

1,5 g. Méně než 15 % ornidazolu se váže na bílkoviny v plazmě.<sup>20</sup> Je široce distribuován do většiny tělesných tkání a tekutin, včetně mozkomíšního moku.<sup>21</sup> Metabolizuje se v játrech a přeměňuje se oxidačními pochody za vzniku

1chlor-3-(2-hydroxymethyl 5-nitro-1-imidazolyl-2-propanolu, nebo se rozštěpí postranní řetězec a vznikne 2-methyl-5-nitroimidazol. Imidazolový kruh může podlehnout i hydrolytickému štěpení a následné redukci nitro skupiny za vzniku

N-(3-chlor-2-hydroxypropylacetamidu a acetamidu.<sup>22</sup> Vylučuje se převážně močí hlavně jeho konjugáty a metabolity, stolicí se eliminuje v menší míře. Jednotlivá perorální dávka tohoto léčiva je z těla odstraněna během 5 dní.<sup>21</sup>

### 1.3 Elektrochemické metody

Elektrochemie má mnoho výhod využití pro farmaceutické analýzy. Elektroanalytické techniky jsou charakterizované instrumentální jednoduchostí, přijatelnými náklady a dobrou přesností. Elektrochemickým metodám lze přičíst i další výhodu, kterou je předpoklad, že oxidačně-redukční mechanismy léčiv probíhající na elektrodách mají obdobný princip jako v těle, tudíž nám umožní nahlédnout do jejich metabolického osudu.<sup>23</sup>

Studované nitroimidazolové deriváty jsou elektrochemicky redukovatelné látky. V současné době se vyvíjejí nové typy pracovních elektrod, na kterých by se dosáhlo nižších mezí stanovitelnosti.

Metronidazol byl zkoumán pomocí skleněné uhlíkové elektrody potažené tenkým filmem nanomateriálu s dosaženým limitem detekce  $6,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L.<sup>24</sup> Nanomateriál se aplikoval i na zlatou elektrodu a bylo zkoumáno elektrochemické chování metronidazolu a získané výsledky na takto připravené elektrodě porovnány s výsledky na jiných typech elektrod. Mezí stanovitelnosti byla  $1,5 \cdot 10^{-7}$  mol/L.<sup>25</sup> Pro stanovení metronidazolu byl sestrojen i vysoce selektivní senzor pro tuto látku, který byl začleněn do uhlíkové pastové elektrody a následně použit pro katodickou rozpouštěcí voltametrii, u které byla získaná mez detekce  $2,1 \cdot 10^{-10}$  mol/L.<sup>26</sup>

Redukce ornidazolu byla zkoumána pomocí kompozitní polymerní membránové elektrody, která byla konstruována z platinové fólie a spojovala monomery pyrrolu a anilinu. Získané výsledky na takto připravené elektrodě byly porovnány s výsledky naměřenými na skleněné uhlíkové pastové elektrodě a byly srovnatelné.<sup>27</sup>

Pro stanovení studovaných látek v lékových formách byla použita aktivovaná skleněná elektroda<sup>28, 29</sup> nebo visící rtuťová kapková elektroda<sup>30</sup>

Metronidazol byl stanoven v lidské krevní plazmě adsorpční rozpouštěcí voltametrií na visící rtuťové kapkové elektrodě. Vzorek plazmy byl smíchán s hydroxidem barnatým a síranem zinečnatým a odstředěn při 2000 otáčkách za minutu, aby došlo k oddělení bílkovin plazmy.<sup>31</sup> Nitroimidazoly byly stanoveny v potravinách (med a mléko) diferenční pulzní voltametrií na visící rtuťové kapkové elektrodě.<sup>7</sup>

## 1.4 Separační metody

Nitroimidazolové deriváty lze separovat a stanovit pomocí kapilární elektroforézy. Pro oddělení imidazolových a triazolových derivátů se využívalo chirálních selektorů cyklodextrinů a jeho derivátů nebo crown etherů.<sup>32</sup> Další studie se zabývala separací enantiomerů vybraných léčiv za přítomnosti heptakis (2,3,6-tri-*o*-methyl)  $\beta$ -cyklodextrinu, ve které bylo úspěšně identifikováno přes 50 % zvolených léčiv.<sup>33</sup> Kapilární zónová elektroforéza byla také aplikována pro separace směsi obsahující 1,4 benzodiazepiny s omeprazolem a metronidazolem a následně se výsledky porovnávaly s alternativními analytickými metodami jako je RP-HPLC a diferenční pulzní polarografie. Limity detekce u CZE a alternativních analytických metod byly srovnatelné.<sup>34</sup>

Metronidazol byl stanoven pomocí CZE většinou s UV detekcí<sup>35</sup> nebo za pomoci amperometrické detekce se zlatou mikroelektrodou. Detekční limit byl  $6,0 \cdot 10^{-7}$  mol/L.<sup>36</sup> Ornidazol společně s ofloxacinem byl stanoven pomocí CZE a spektrofotometrické detekce při 230 nm.<sup>37</sup>

Ve farmaceutických preparátech obsahující společně miconazole nitrate a metronidazol se uplatnila plynová chromatografie. Detekce byla provedena pomocí plameno-ionizačního detektoru. Limit detekce této metody byl  $2,5 \mu\text{g/mL}$ .<sup>38</sup> Pro stanovení pomocí kapalinové chromatografie byl předřazen extrakční krok vzorků (kapalina do kapaliny)<sup>39</sup> nebo přečistění extrakcí na pevné fázi.<sup>40</sup>

Detekce u HPLC byla většinou spektrofotometrická<sup>41</sup> nebo se používá hmotnostní spektrometrie pomocí elektrospreje.<sup>42,43</sup> Vysokoučinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi a izokratickou elucí byla použita pro stanovení metronidazolu vedle amoxicilinu. Mez stanovitelnosti byla  $0,13 \text{ g/mL}$ .<sup>44</sup> RP-HPLC byla využita pro studii separace binární směsi obsahující ciprofloxacin hydrochlorid s metronidazolem a výsledky byly porovnány s chromatografií na tenké vrstvě (TLC) a následným denzitometrickým

měření.<sup>45</sup>

Pro metodu stanovení metronidazolu v biologických tekutinách byla využita i vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie s obrácenými fázemi s kvantifikací dosažené skenovacím denzitometrem. Reakce probíhala do koncentrace 180 µg/mL lineárně.  $L_Q$  této metody byla 0,5 µg/mL.<sup>46</sup>

Separční metody se hojně využívají vzhledem k jejich citlivosti, selektivitě, rychlosti analýzy. K jejich nevýhodám patří vysoká pořizovací a provozní cena.

## 1.5 Spektrální metody

Nitroimidazoly lze stanovit pomocí spektrofotometrie bez předchozího separačního kroku v binární směsi v ultrafialové oblasti spektra<sup>47</sup> nebo ve většině případech dochází k redukci jejich nitro skupiny za vzniku barevných produktů a následné proměření absorpčních spekter ve viditelné oblasti.<sup>48-52</sup>

Jako kvantitativní analýza pro stanovení metronidazolu v léčivech nebo vzorcích moči byla použita nukleární magnetická rezonance (NMR).<sup>53</sup>

Běžně se využívá spektrometrie pro detekci nitroimidazolů u separačních metod.<sup>54</sup>

## 2. Experimentální část

### 2.1 Reagencie

Zásobní roztoky metronidazolu (Sigma-Aldrich) a ornidazolu (Sigma-Aldrich) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/L byly připraveny rozpuštěním přesně naváženého množství dané látky (metronidazolu 34,54 mg a ornidazolu 44 mg) ve 200 mL deionizované vodě. Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobních roztoků studovaných látek deionizovanou vodou. Deionizovaná voda byla používána Milli Q plus system, Millipore, USA. Všechny roztoky byly uchovány ve skleněných odměrných baňkách opatřených plastovými zátkami v temnu za laboratorní teploty.

Další použité chemikálie: kyselina boritá (p.a. Lachema o.p. Brno), kyselina octová (p.a. Lach:Ner), kyselina orthofosforečná (p.a. Lach:Ner), hydroxid sodný (p.a. Penta), chlorid draselný (p.a. Lach: Ner), chelaton III.(p.a. Lachema).

Brittonovy-Robinsonovy (BR) tlumivé roztoky o příslušném pH byly připraveny mísením hydroxidu sodného o koncentraci 0,2 mol/L s roztokem obsahující kyselinu boritou, octovou a fosforečnou o koncentraci 0,04 mol/L.

Přesná hodnota pH byla měřena pomocí digitálního pH-metru Jenway 4330 (Jenway, Essen, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou.

### 2.2 Aparatura

Při všech voltametrických stanovení byla používána osobním počítačem řízená sestava Eco-Tribo Polarograf pracující se softwarem Polar Pro verze 2.0 (Eco-Trend Plus, Praha, ČR). Software pracoval v operačním systému Microsoft Windows 3.11 (Microsoft Corporation, USA).

Měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení. Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda 207 11 (Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Praha, ČR) byla použita jako pracovní elektroda, jako referentní elektroda byla použita elektroda argenchloridová (3 mol/L KCl) typu ETP CZ-R1101 a jako pomocná elektroda pak platinová drátková elektroda typu ETP CZ P00906 (obě Eco-Trend Plus, Praha, ČR). Při metodě DPV byly na pracovní elektrodu vkládány pulzy o šířce 100 ms a výšce -50 mV. Rychlost nárůstu potenciálu činila 20 mV/s, stejně jako při metodě DCV.



Spektrofotometrická měření stability zásobního roztoku byla prováděna na přístroji Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA), ovládaném programem UV-Visible ChemStation (Agilent Technologies, USA), v křemenných kyvetách měrné tloušťky 0,1 cm (Hellma, Nizozemí).

### 2.3 Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda

Ideální pracovní elektrody by měly mít nízký odpor, chemickou a elektrochemickou inertnost v širokém rozsahu potenciálů, co nejširší potenciálové okno, snadné obnovení elektrochemického povrchu, nízkou cenu a neměly by být toxické.<sup>55</sup>

V polarografii, voltametii a příbuzných oborech zaujala mimořádné postavení rtuťová kapková elektroda. Tato elektroda má takovéto postavení díky kvalitě povrchu a jeho obnovovatelnosti.<sup>56</sup>

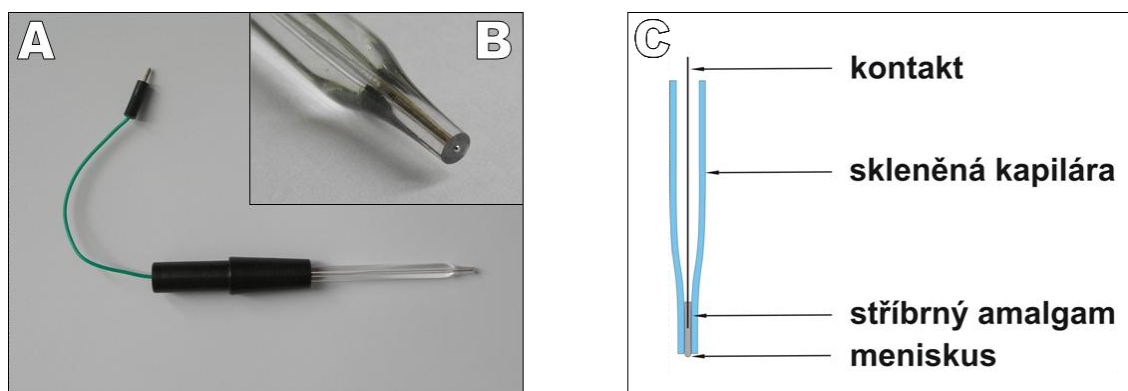
Proto se pracovní elektrody na základě kovové rtuti ( kapající rtuťová elektroda, visící rtuťová kapková elektroda) považují za dosud nepřekonatelný standard a jsou nejlepší z hlediska reprodukovatelnosti výsledků měření.<sup>57, 58</sup>

Avšak obavy z toxicity rtuti<sup>59</sup> a přísné ekologické a bezpečnostní předpisy vedou k vývoji nových elektrodových materiálů, mezi nimiž vynikají netoxické pevné amalgamové elektrody.<sup>60</sup> Na amalgamové elektrody se zaměřil výzkum před 8 lety.<sup>57</sup> Hlavním motivem byla původně snaha zavést elektrody typu netoxických amalgamů, které se používaly na přípravu zubních plomb.<sup>61</sup> Tuhé či pastové amalgamové elektrody vyvinuté na ústavu Fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR mají celou řadu předností. Jsou netoxické, tudíž přívětivé k životnímu prostředí, mají dostupné potenciálové okno srovnatelné s visící rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE). Dále jsou mechanicky robustní a stejně jako rtuťové elektrody jsou vhodné pro stanovení elektrochemicky redukovatelných látek, i když se v některých ohledech liší.<sup>55</sup>

Tento typ pracovních elektrod lze připravit prakticky v každé laboratoři za použití vhodné skleněné trubičky, která se na jednom konci zahřátím zúží a následně zaleští smirkovým papírem. Do takto připravené skleněné trubičky se vpraví stříbrný prášek, který se upěchuje platinovým drátkem. Ústí elektrody se ponoří na noc do kapalné rtuti.<sup>62</sup>

Tím vznikne mechanicky stabilní a netoxický amalgam.<sup>63-66</sup> Přes obrovský potenciál současných spektrometrických a separačních metod je zřejmé, že soudobé elektrochemické a elektroanalytické metody, zvláště pokud využívají moderních elektrodových materiálů

a progresivních přístupů, mohou v řadě případů představovat konkurenceschopnou alternativu.<sup>62</sup>



**Obr. 2.1** Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda m-AgSAE (A), detail menisku (B) a schéma elektrody (C).

## 2.4 Pracovní postupy

### 2.4.1 Předúprava elektrody

Předúprava pracovní elektrody m-AgSAE se skládá ze tří základních kroků. Prvním byla amalgamace, která byla prováděna jednou týdně a kdykoli v případě zhoršení proudové odezvy. Dolní část elektrody byla ponořena do lahvičky s kapalnou rtuťí a mícháním po dobu 15 s byl obnoven rtuťový meniskus elektrody.

Následovala elektrochemická aktivace, která byla prováděna na počátku každého pracovního dne pomocí roztoku KCl o koncentraci 0,2 mol/L při vloženém napětí - 2200 mV po dobu 300 s. Docházelo k odstranění adsorbovaných látek z povrchu elektrody. Účelem bylo zlepšit citlivost měření a jejich opakovatelnost.

Třetím krokem byla regenerace. Krok regenerace byl zařazen před každé měření. Jednalo se o skokové střídání počátečních regeneračních potenciálů (kladnější) a konečných regeneračních potenciálů (zápornější) v intervalu 0,1 s po dobu 300 s. U vlivu pH na voltametrická měření byly nalezeny optimální regenerační potenciály pro každou hodnotu pH. Regenerační potenciály obou látek pro všechny hodnoty pH jsou shrnuty v tabulce 2.2.

## 2.4.2 Voltametrie

Při voltametriických měřeních pH závislostí a opakovatelností bylo do 10 mL odměrné baňky odpipetováno příslušné množství roztoku studované látky ve vodě a roztok byl následně doplněn BR pufrem o příslušném pH po rysku. Základní elektrolyt se připravoval obdobně, do 10 mL odměrné baňky byl odpipetován 1 mL deionizované vody a doplněn BR pufrem o příslušném pH. Takto připravený a promíchaný roztok byl kvantitativně převeden do polarografické nádoby a probublán dusíkem po dobu 5 minut. Dusík byl do polarografické nádoby přiváděn přes promývačku, která obsahovala deionizovanou vodu.

Pro proměření kalibračních závislostí se příslušné množství vzorku přidávalo k základnímu elektrolytu, pouze nejvyšší řád ( $2 \cdot 10^{-5}$  -  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) byl připraven do jednotlivých 10 mL odměrných baněk.

Voltametriické měření v modelových vzorcích pitné a říční vody bylo provedeno metodou přidavku ze zásobního roztoku studované látky ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/L). Pitná voda byla získána z vodovodní sítě v budově Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a říční voda byla odebrána z Vltavy v oblasti Praha-Výtoň. Říční voda byla přefiltrována. Měřený roztok byl připraven tak, že do 10 mL odměrné baňky bylo odpipetováno 9 mL vzorku vody (pitné nebo říční), následně přidáno 0,1 mL chelatonu III. a 0,9 mL BR pufru.

Při stanovení obsahu metronidazolu v lékových formách bylo postupováno následovně. Tableta i vaginální tableta Entizolu byla zvážena a následně rozpuštěna v deionizované vodě. Obě tablety byly složeny i z dalších pomocných látek nerozpustných ve vodě, proto byly tyto látky odfiltrovány a roztok kvantitativně převeden do odměrné baňky. Tableta Entizol byla ve 100 mL odměrné baňce a vaginální tableta Entizol byla v 500 mL odměrné baňce. Z takto připravených odměrných roztoků obou tablet bylo odpipetováno vhodné množství do 10 mL odměrné baňky a následně doplněno BR pufrem. Obsah metronidazolu byl stanoven v pěti tabletách. Z infuzního roztoku – Efloranu bylo odpipetováno vhodné množství do 10 mL odměrné baňky a doplněno BR pufrem.

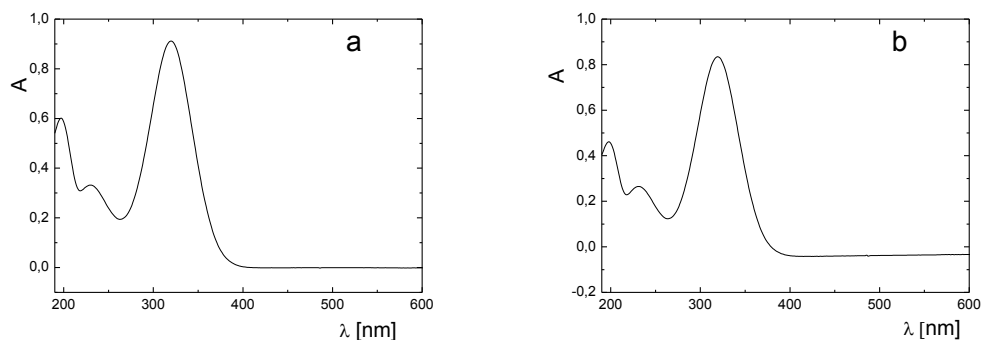
Následně byla zvolena v programu Polar 5.1 daná voltametriická metoda a poté byl proveden záznam voltametriické křivky. Veškeré voltametriické křivky byly měřeny 3 krát, nejnižší a nejvyšší koncentrace byla měřena 10 krát a následně statisticky vyhodnoceny. Mezi jednotlivými měřeními byly elektrody opláchnuty deionizovanou vodou.

### 2.4.3 Spektrofotometrie

Stálost zásobních roztoků obou látek o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/L byla sledována spektrofotometricky v křemenných kyvetách o tloušťce 0,1 cm.

Proměření kalibračních roztoků bylo provedeno v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm. Jako blank se používala deionizovaná voda.

Absorbance obou zásobních roztoků byla měřena v rozmezí vlnových délek 200-800 nm. Absorpční spektra obou látek jsou uvedeny na obr. 2.2. Hodnota molárního absorpčního koeficientu pro metronidazol odpovídala 8824 L/mol·cm při 320 nm. Absorpční koeficient pro ornidazol byl 8762 L/mol·cm při 319 nm. Výsledky měření stability obou roztoků jsou zaznamenány v tabulce 2.1. Z výsledků vyplývá, že během celého měření se koncentrace obou látek uchovaných ve tmě za laboratorní teploty nesnížila. Zásobní roztok metronidazolu lze považovat za stálý po dobu 200 dní. Zásobní roztok ornidazolu lze považovat za stálý po dobu 300 dní.



**Obr. 2.2** Absorpční UV-VIS spektrum metronidazolu (a) a ornidazolu (b), koncentrace obou látek  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/L. Spektrum bylo měřeno proti deionizované vodě v křemenných kyvetách o optické délce 0,1 cm.

**Tabulka 2.1**Absorbance zásobních roztoků metronidazolu a ornidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/L)

Metronidazol			Ornidazol		
Den	$A_{320}$	Relativní A [%]	Den	$A_{319}$	Relativní A [%]
0	0,882	100,00	0	0,878	100,00
5	0,882	100,00	10	0,878	100,00
10	0,882	100,00	20	0,878	100,00
20	0,882	100,00	50	0,878	100,00
30	0,882	100,00	100	0,877	99,99
60	0,882	100,00	150	0,878	100,00
100	0,882	100,00	200	0,877	99,99
200	0,882	100,00	300	0,878	100,00

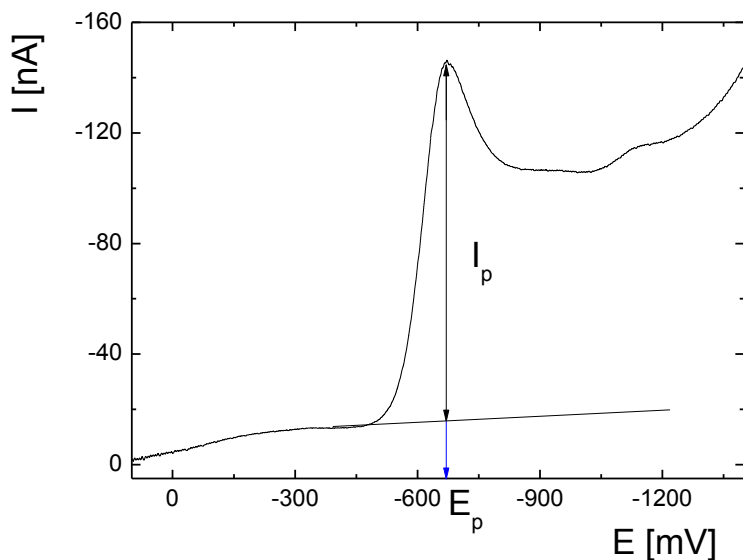
**2.4.4 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení dat**

K provádění výpočtů a tvorbě grafů, které jsou v této práci byly použity následující programy MS Excel (2003, 2007) Microsoft Corporation a Origin 8 (Corporation, USA Origin Lab).

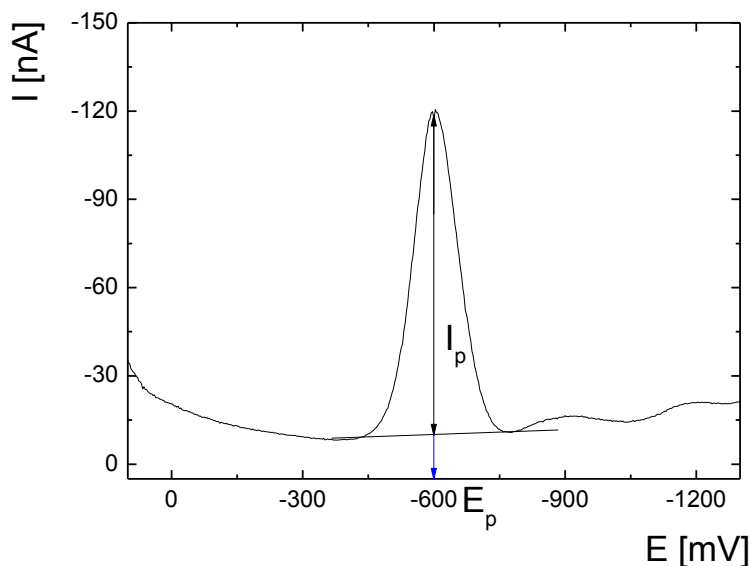
Statistické vyhodnocení opakovatelnosti voltametrických měření na m-AgSAE bylo provedeno dle zavedených chemometrických norem pro tento typ souboru dat. Mez stanovitelnosti byla vypočtena jako desetinásobek směrodatné odchylky deseti měření sledované látky o koncentraci v nejnižším bodě kalibrační přímky.

Na obr. 2.3 je uvedeno vyhodnocení naměřených DC voltamogramů, získané

DP voltamogramy jsou na obr. 2.4. Vyhodnocením voltamogramů obou metod byly získány potenciály píku  $E_p$  a proud píku  $I_p$ . Pro obě studované látky se voltamogramy vyhodnocovaly analogicky.



**Obr. 2.3** Způsob vyhodnocování DC voltamogramů metronidazolu a ornidazolu. DC voltamogram metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L), měřeno na m-AgSAE ve vodném prostředí BR pufru o pH 8,0.  $I_p$  značí proud píku,  $E_p$  potenciál píku.



**Obr. 2.4** Vyhodnocení DP voltamogramů metronidazolu a ornidazolu. DP voltamogram metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L), měřeno na m-AgSAE ve vodném prostředí BR pufru o pH 8,0.  $I_p$  proud píku,  $E_p$  potenciál píku.

## Tabulka 2.2

Regenerační potenciály metronidazolu a ornidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L ), měřeno na m-AgSAE ve vodném prostředí BR pufru při různých pH.

Metronidazol			Ornidazol		
pH	$E_{in}$ [mV]	$E_{fin}$ [mV]	pH	$E_{in}$ [mV]	$E_{fin}$ [mV]
2,0	350	-1000	2,0	300	-1000
3,0	300	-1200	3,0	300	-1250
4,0	250	-1250	4,0	150	-1300
5,0	250	-1300	5,0	100	-1350
6,0	200	-1350	6,0	150	-1400
7,0	200	-1550	7,0	50	-1450
8,0	150	-1600	8,0	50	-1500
9,0	100	-1600	9,0	0	-1550
10,0	0	-1700	10,0	-100	-1600
11,0	-50	-1750	11,0	-150	-1700
12,0	-100	-1800	12,0	-150	-1850

### 3. DC voltametrie a diferenční pulzní voltametrie

#### 3.1 Metronidazol

##### 3.1.1 Vliv pH

Bylo studováno chování metronidazolu DC voltametří (DCV) a diferenční pulzní voltametří (DPV). Nejprve byl proměřen vliv pH na DC a DP voltamogramy metronidazolu na m-AgSAE ve vodných roztocích obsahujících BR pufr o dané hodnotě pH. V těchto roztocích byla koncentrace metronidazolu  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L. Závislost byla měřena v rozsahu pH 2-12. Studovaná látka poskytuje v tomto rozmení pH jeden dobře vyvinutý pík. Údaje pro sudé hodnoty pH pro obě metody jsou uvedeny na obr. 3.1. V tabulce 3.1 je uveden vliv pH na DC a DP voltamogramy na m-AgSAE ve vodném prostředí BR pufru.

Pro závislost  $E_p$  na pH byl zjištěn následující vztah:

$$\text{DCV: } E_p [\text{mV}] = -52,89 \text{ pH} - 239,13 \quad (R = -0,9760)$$

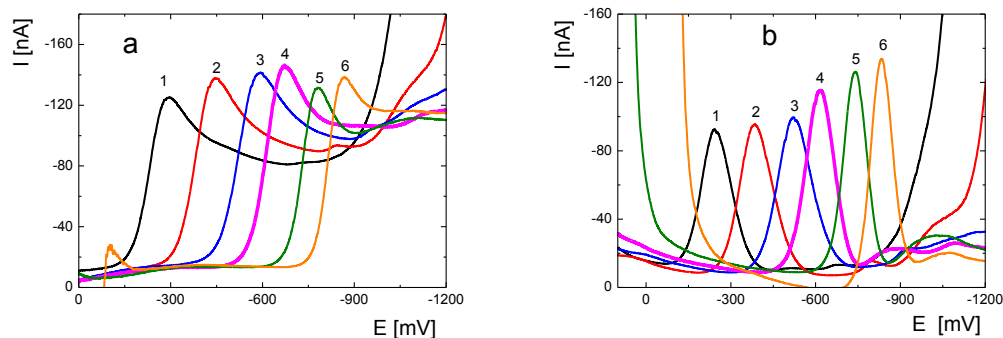
$$\text{DPV: } E_p [\text{mV}] = -56,31 \text{ pH} - 156,47 \quad (R = -0,9831)$$

#### Tabulka 3.1

Vliv pH na DC a DP voltamogramy metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) na m-AgSAE ve vodném prostředí BR pufru

pH	DCV		DPV	
	$-E_p$ [mV]	$-I_p$ [nA]	$-E_p$ [mV]	$-I_p$ [nA]
2,0	293	109,7	242	78,5
3,0	400	118,4	310	80,5
4,0	452	112,7	383	88,2
5,0	535	119,3	469	89,2
6,0	589	119,9	520	88,2
7,0	623	120,9	562	93,9
8,0	673	128,5	614	112,3
9,0	705	116,0	642	102,0
10,0	783	115,1	743	102,9
11,0	784	96,7	736	104,1
12,0	866	123,1	836	123,5



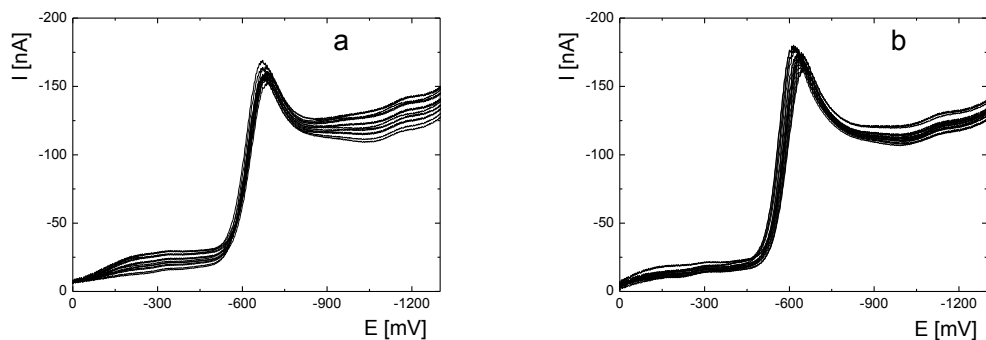


**Obr. 3.1** DC voltamogramy (a), DP voltamogramy (b) metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) měřeno na m-AgSAE ve vodných roztocích BR pufrů. Zobrazeny sudé hodnoty pH: 2,0 (1); 4,0 (2); 6,0 (3); 8,0 (4); 10,0 (5); 12,0 (6).

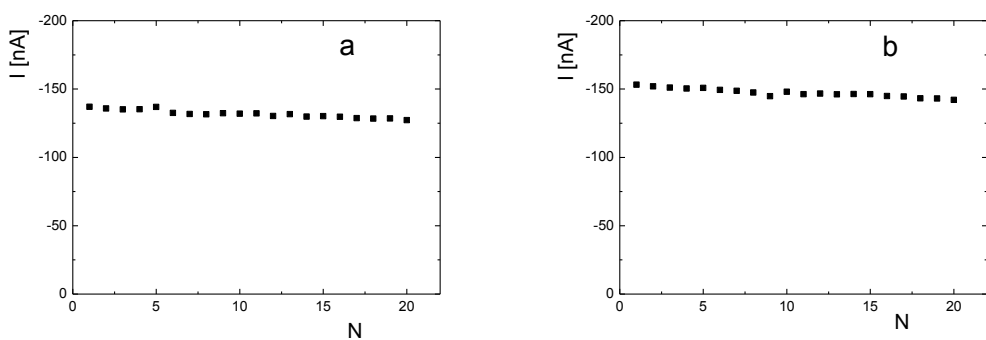
### 3.1.2 Vliv regenerace na m-AgSAE

Dále bylo DC a DP voltametrií zjišťováno, zda je nutná aplikace regeneračních potenciálů na m-AgSAE a následné zařazení kroku regenerace k sestrojení kalibračních závislostí. DC a DP voltamogramy metronidazolu, které byly naměřeny bez vložení regeneračních potenciálů na m-AgSAE při zvoleném optimálním pH nedosahovaly tak vysokých hodnot proudu. DC voltamogramy jsou uvedené na obr. 3.2 (a) a DP voltamogramy na obr. 3.4 (a). Pro velikost proudové odezvy byla pro 20 měření u DC voltametrie relativní směrodatná odchylka 2,2 % a pro diferenční pulzní voltametrii byla opakovatelnost 20 měření 3,0 %. Obr. 3.3 (a) znázorňuje závislost velikosti proudu na počtu měření pro DC techniku a obr. 3.5 (a) stejnou závislost pro DP techniku.

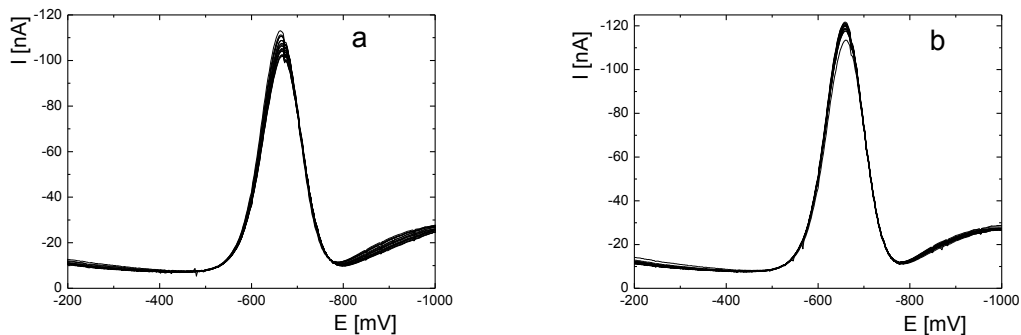
DC voltamogramy metronidazolu v roztoku BR pufru o optimálním pH naměřené na m-AgSAE s vložení regeneračních potenciálů  $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1600$  mV, po dobu 30 s před každým měřením jsou uvedeny na obr. 3.2 (b), DP voltamogramy metronidazolu na obr. 3.4 (b). Při aplikaci regeneračního kroku došlo k mírnému zvýšení proudové odezvy a zlepšení opakovatelnosti. Relativní směrodatná odchylka pro DC voltametrii se snížila na 1,2 %, obr. 3.3 (b) a u diferenční pulzní voltametrie 1,5 %, obr. 3.5 (b). Z dosažených výsledků vyplývá, že u obou voltametrických metod byla zařazena aplikace regeneračních potenciálů k sestrojení kalibračních závislostí.



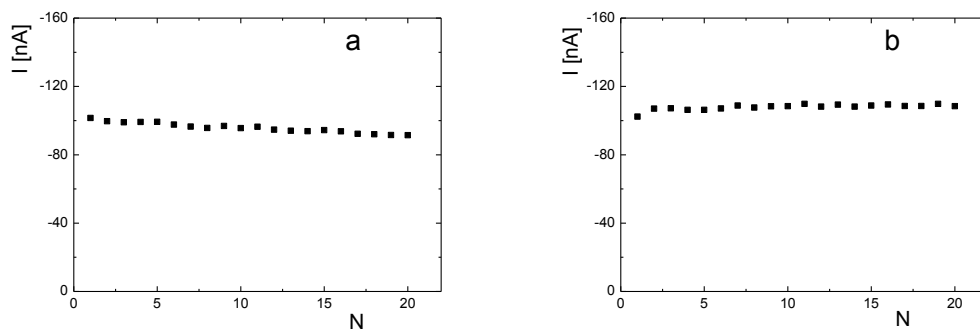
**Obr. 3.2** DC voltamogramy metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) na m-AgSAE ve vodném prostředí BR pufru o pH 8,0. Měřeno bez aplikace regeneračních potenciálů (a), měřeno s aplikací regeneračních potenciálů,  $E_{in} = 150$  mV a  $E_{fin} = -1600$  mV (b).



**Obr. 3.3** Závislost proudu píku metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) na pořadovém čísle měření ( $N$ ) bez vložení regeneračních potenciálů (a), s vložení regeneračních potenciálů na m-AgSAE:  $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1600$  mV (b). DC voltametrie.



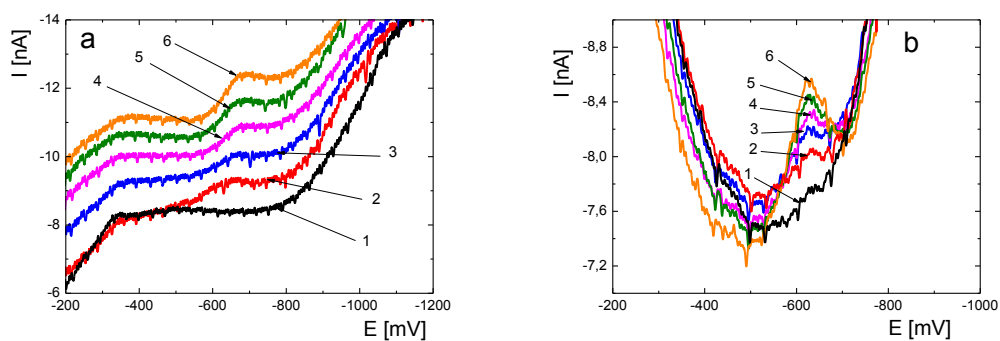
**Obr. 3.4** DP voltamogramy metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) na m-AgSAE ve vodném prostředí BR pufru o pH 8,0. Měřeno bez aplikace regeneračních potenciálů (a), měřeno s aplikací regeneračních potenciálů na m-AgSAE:  $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1600$  mV (b).



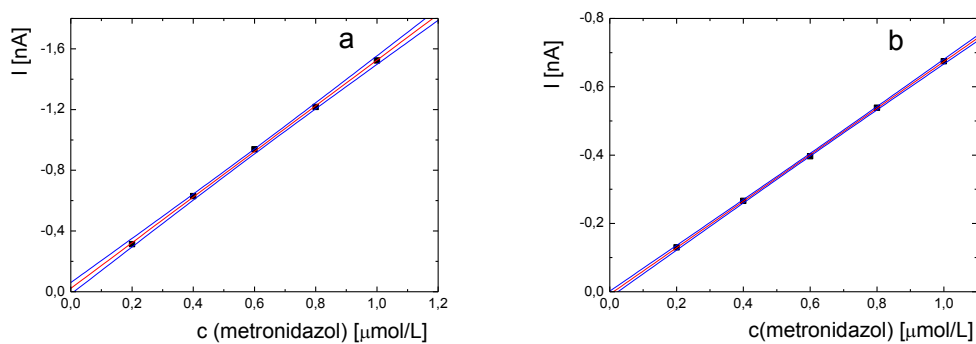
**Obr. 3.5** Závislost proudu píku metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) na pořadovém čísle měření ( $N$ ) bez vložení regeneračních potenciálů (a), s vložím regeneračních potenciálů na m-AgSAE:  $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1600$  mV (b). DP voltametrie.

### 3.1.3 Kalibrační závislost

Kalibrační závislosti metronidazolu byly sestrojeny u obou voltametrických metod v rozmezí koncentrací  $2 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L. Za optimální podmínky bylo vybráno pH BR pufru 8,0, protože po vyhodnocení voltamogramů bylo zjištěno, že studovaná látka poskytuje v tomto prostředí nejlépe vyvinutý pík a u DCV i nejvyšší proudovou odezvu. DC voltamogramy pro nejnižší řád ( $2 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-6}$  mol/L) jsou uvedeny na obr. 3.6 (a), DP voltamogramy pro řád  $2 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-6}$  mol/L jsou na obr. 3.6 (b). Kalibrační přímky pro nejnižší řád ( $2 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-6}$  mol/L) jsou uvedeny na obr. 3.7. Parametry kalibračních přímek obou voltametrických metod jsou shrnuty v tabulce 3.2 a v tabulce 3.3 je uvedena opakovatelnost měření nejnižší a nejvyšší naměřené koncentrace metronidazolu oběma voltametrickými metodami.



**Obr. 3.6** DC voltamogramy (a), DP voltamogramy (b) metronidazolu v rozsahu koncentrací  $2 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-6}$  mol/L. Základní elektrolyt (1); koncentrace metronidazolu v  $\mu\text{mol/L}$  0,2 (2); 0,4 (3); 0,6 (4); 0,8 (5); 1 (6). Měřeno ve vodném roztoku BR pufru o pH 8,0 na m-AgSAE s aplikací regeneračních potenciálů:  $E_{\text{in}} = 150$  mV,  $E_{\text{fin}} = -1600$  mV.



**Obr. 3.7** Závislosti proudu píku na koncentraci metronidazolu v rozmezí koncentrací 0,2-1  $\mu\text{mol/L}$ , DC voltametrie (a), DP voltametrie (b).

### Tabulka 3.2

Parametry kalibračních přímek stanovení metronidazolu DC voltametrií a DP voltametrií na m-AgSAE ve vodném prostředí BR pufru o pH 8,0 s regeneračním krokem.  $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1600$  mV.

	$c$ [mol/L]	Směrnice <sup>a</sup> [mA·L/mol]	Úsek <sup>b</sup> [nA]	$R$	$L_Q$ [mol/L]
	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$-1,408 \pm 0,012$	$-0,028 \pm 0,788$	$-0,9997$	-
DCV	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-1,326 \pm 0,016$	$-0,164 \pm 0,106$	$-0,9994$	-
	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$-1,503 \pm 0,018$	$-0,022 \pm 0,012$	$-0,9994$	$3,2 \cdot 10^{-7}$
	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$-1,151 \pm 0,005$	$0,746 \pm 0,300$	$-0,9999$	-
DPV	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-1,022 \pm 0,012$	$0,055 \pm 0,081$	$-0,9994$	-
	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$-0,681 \pm 0,004$	$0,080 \pm 0,030$	$-0,9998$	$1,9 \cdot 10^{-7}$

a – intervaly představující horní a dolní konfidenční limity ( $\alpha = 0,05$ )

b – úseky nejsou statisticky významně odlišné od nuly na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$

### Tabulka 3.3

Statistické vyhodnocení opakovatelnosti metronidazolu DC a DP voltametří na m-AgSAE pro nejnižší koncentraci  $2 \cdot 10^{-7}$  mol/L a nejvyšší koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L ve vodném prostředí BR pufru o pH 8,0; počet měření  $n = 10$ , hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ .

	$c$ [mol/L]	$\tilde{x}$ [nA]	$L_{1,2}$ [nA]	$s$ [nA]	$s_r$ [%]
DCV	$1 \cdot 10^{-4}$	-143,70	-0,78	-1,01	0,70
	$2 \cdot 10^{-7}$	-0,390	-0,035	-0,049	12,6
DPV	$1 \cdot 10^{-4}$	-115,15	-0,32	-0,46	0,40
	$2 \cdot 10^{-7}$	-0,0672	-0,0090	-0,0127	18,9

## 3.2 Ornidazol

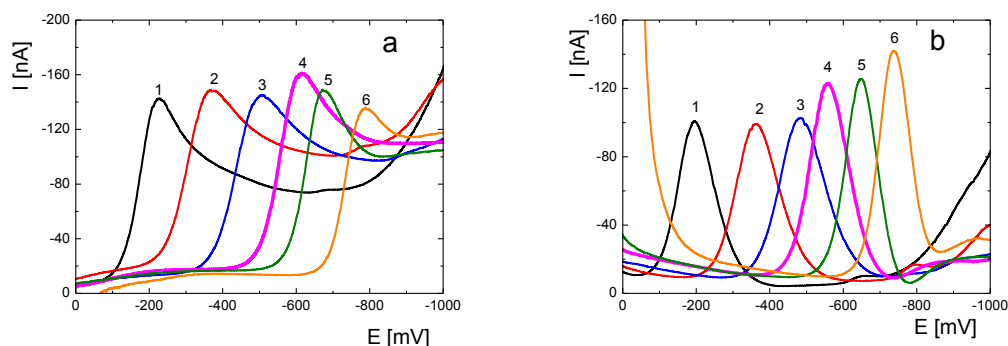
### 3.2.1 Vliv pH

Nejprve byl studován vliv pH na ornidazol pomocí DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV). Závislost na pH byla měřena v roztocích obsahující ornidazol o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L na m-AgSAE. Ornidazol poskytuje v celé škále pH jeden dobře vyvinutý pík, který byl následně vyhodnocen. Na obr. 3.8 (a) jsou uvedeny DC voltamogramy s měnícím se pH, obr. 3.8 (b) znázorňuje DP voltamogramy. V tabulce 3.4 jsou shrnuty potenciály  $E_p$  a proudy  $I_p$  vyhodnoceného píku ornidazolu pro jednotlivé hodnoty pH.

Pro závislost  $E_p$  na pH byl zjištěn následující vztah:

$$\text{DCV: } E_p [\text{mV}] = -51,02 \text{ pH} - 173,96 \quad (R = -0,9714)$$

$$\text{DPV: } E_p [\text{mV}] = -49,96 \text{ pH} - 154,44 \quad (R = -0,9784)$$



**Obr. 3.8** DC voltamogramy (a), DP voltamogramy (b) ornidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) měřeno na m-AgSAE ve vodných roztocích BR pufrů. Zobrazeny sudé hodnoty pH 2,0 (1); 4,0 (2); 6,0 (3); 8,0 (4); 10,0(5); 12,0 (6).

### Tabulka 3.4

Chování ornidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) při různých hodnotách pH ve vodném prostředí BR pufru, naměřeno na m-AgSAE metodami DCV a DPV.

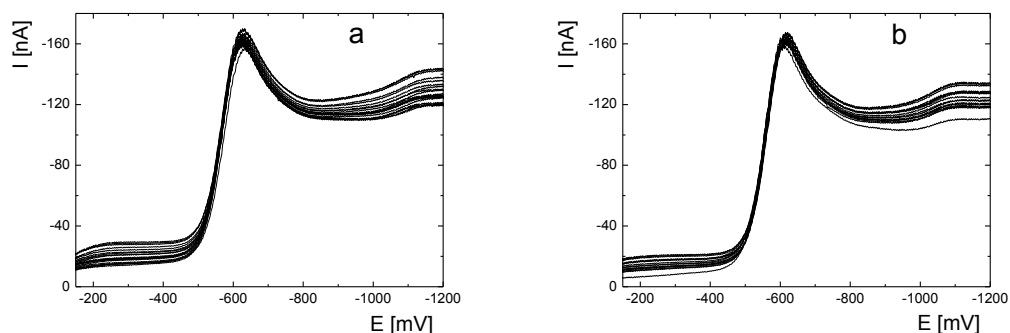
DCV			DPV		
pH	$-E_p$ [mV]	$-I_p$ [nA]	pH	$-E_p$ [mV]	$-I_p$ [nA]
2,0	230	127,5	2,0	198	91,9
3,0	346	128,8	3,0	316	98,9
4,0	368	131,9	4,0	363	90,4
5,0	438	124,7	5,0	422	96,2
6,0	509	122,9	6,0	484	92,5
7,0	532	133,4	7,0	522	106,4
8,0	617	139,3	8,0	560	116,4
9,0	652	138,9	9,0	605	115,2
10,0	675	130,6	10,0	648	116,8
11,0	686	118,1	11,0	687	116,3
12,0	789	120,5	12,0	741	122,8

### 3.2.2 Opakovatelnost měření

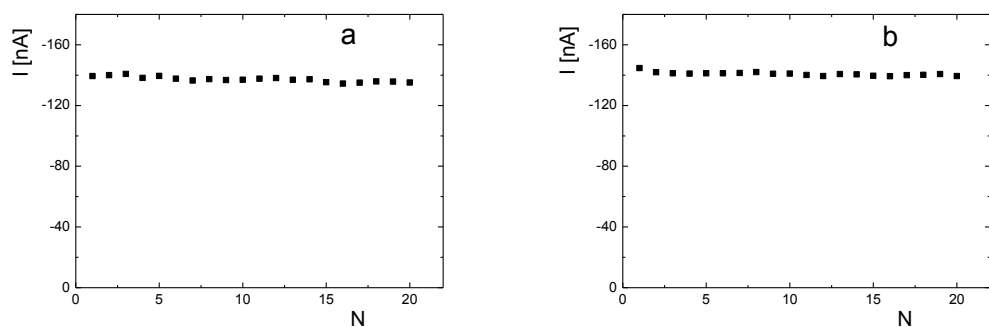
Pro ornidazol byl prostudován vliv vkládání regeneračních potenciálů na pracovní elektrodu na opakovatelnost měření pomocí DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV). Výsledné voltamogramy jsou uvedeny na obr. 3.9 (a), pro DC voltimetrii a obr. 3.10 (a) znázorňuje závislost proudu píku ornidazolu na pořadovém čísle měření DC voltimetrií bez aplikace regeneračních potenciálů, obr. 3.10 (b) stejnou závislost, ale s vložením regeneračních potenciálů. Na obr. 3.11 (a) jsou uvedeny DP voltamogramy ornidazolu bez regeneračního kroku a s regeneračním krokem jsou na obr.3.11 (b). Pokud byl vynechán regenerační krok před každým měřením, odezva byla poměrně stabilní. Při využití regeneračních potenciálů na pracovní elektrodu:  $E_{in} = 50$  mV,  $E_{fin} = -1500$  mV před každým měřením byl signál stabilní a po následném vyhodnocení bylo zjištěno, že došlo k mírnému zvýšení proudové odezvy. Pro měření bez regeneračního kroku byla vypočtena relativní směrodatná odchylka výběru pro DCV 1,3 % a pro DPV 2,3 %, obr. 3.12 (a). Relativní směrodatná odchylka pro měření s aplikací



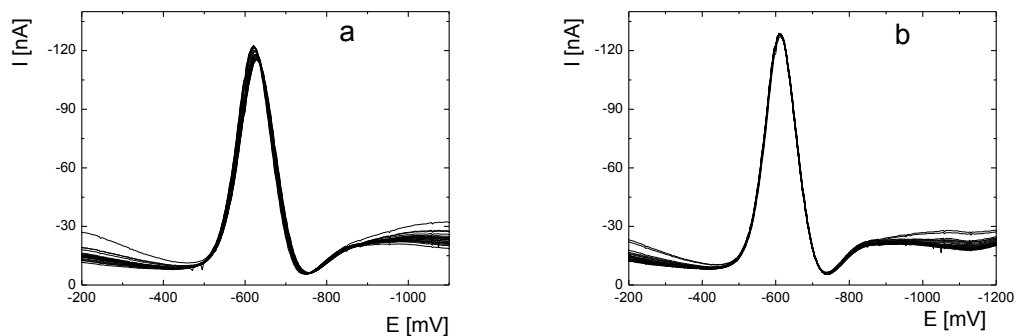
regeneračních potenciálů byla pro DCV 0,9 % a pro DPV 0,5 %, obr. 3.12 (b).



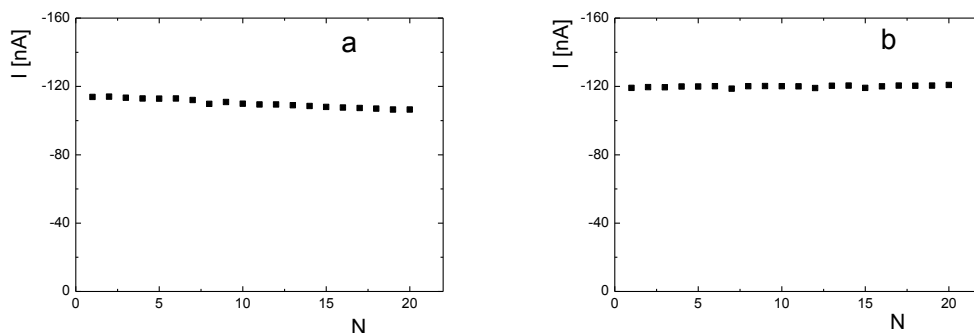
**Obr. 3.9** DC voltamogramy ornidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) měřené bez aplikace regeneračních potenciálů (a), měřené s aplikací regeneračních potenciálů:  $E_{in} = 50$  mV,  $E_{fin} = -1500$  mV na m-AgSAE (b) ve vodném prostředí BR pufru o pH 8,0.



**Obr. 3.10** Závislost proudu píku ornidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) na pořadovém čísle měření ( $N$ ) bez vložení regeneračních potenciálů (a), měření s vložení regeneračních potenciálů:  $E_{in} = 50$  mV,  $E_{fin} = -1500$  mV (b). DC voltametrie.



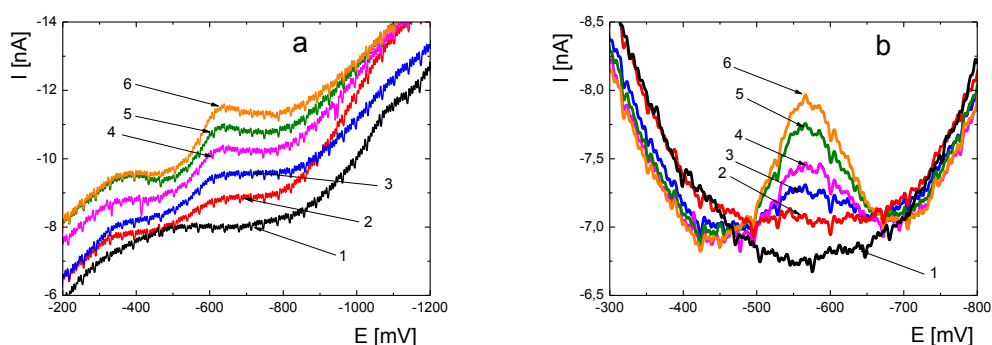
**Obr. 3.11** DP voltamogramy ornidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L), měřeno bez aplikace regeneračních potenciálů (a), měřeno s aplikací regeneračních potenciálů:  $E_{in} = 50$  mV,  $E_{fin} = -1500$  mV na m-AgSAE (b) ve vodném prostředí BR pufru o pH 8,0.



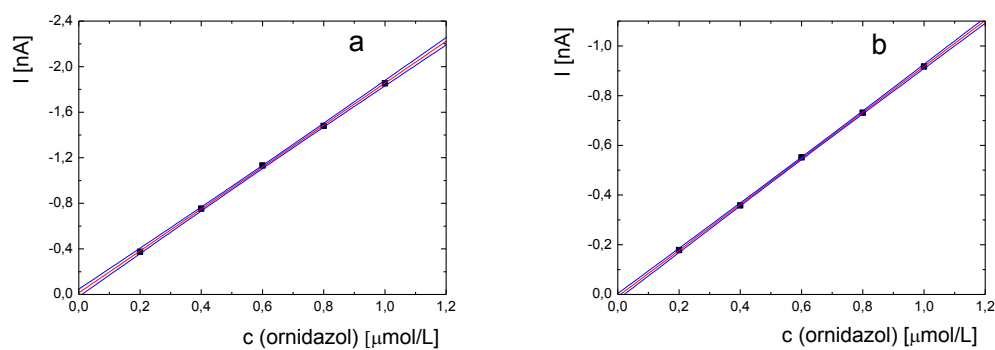
**Obr. 3.12** Závislost proudu píku ornidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) na pořadovém čísle měření ( $N$ ) bez vložení regeneračních potenciálů (a), měření s vložení regeneračních potenciálů  $E_{in} = 50$  mV,  $E_{fin} = -1500$  mV (b). DP voltametrie.

### 3.2.3 Kalibrační závislost

Na obr. 3.13 (a) jsou zobrazeny DC voltamogramy, na obr. 3.13 (b) jsou uvedeny DP voltamogramy ornidazolu pro nejnižší koncentrační řád  $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$  mol/L. Měření bylo provedeno na m-AgSAE ve vodném prostředí BR pufru o pH 8,0 s aplikací regeneračních potenciálů:  $E_{in} = 50$  mV,  $E_{fin} = -1500$  mV. Na obr. 3.14 Jsou uvedeny kalibrační přímky pro nejnižší naměřený řád. Koncentrace  $2 \cdot 10^{-7}$  mol/L byla považována za nejnižší vyhodnotitelnou. Charakteristiky kalibračních přímek pro obě voltametrické metody byly shrnuty do tabulky 3.5, v tabulce 3.6 je statisticky vyhodnocené měření opakovatelnosti pro nejnižší stanovitelnou koncentraci  $2 \cdot 10^{-7}$  mol/L a nejvyšší stanovitelnou koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/L.



**Obr. 3.13** DC voltamogramy (a), DP voltamogramy (b) ornidazolu v rozsahu koncentrací  $2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$  mol/L. Základní elektrolyt (1); koncentrace ornidazolu v  $\mu\text{mol/L}$  0,2 (2); 0,4 (3); 0,6 (4); 0,8 (5); 1 (6). Měřeno ve vodném roztoku BR pufru o pH 8,0 na m-AgSAE s aplikací regeneračních potenciálů:  $E_{in} = 50$  mV  $E_{fin} = -1500$  mV.



**Obr. 3.14** Závislosti proudu píku na koncentraci ornidazolu v rozmezí koncentrací 0,2-1  $\mu\text{mol/L}$ , DC voltametrie (a), DP voltametrie (b).

### Tabulka 3.5

Charakteristiky kalibračních přímek stanovení ornidazolu metodami DCV a DPV ve vodném roztoku BR pufru o pH 8,0 naměřené na m-AgSAE s regeneračním krokem před každým měřením.  $E_{\text{in}} = 50 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{fin}} = -1500 \text{ mV}$ .

	$c$ [mol/L]	Směrnice <sup>a</sup> [mA·L/mol]	Úsek <sup>b</sup> [nA]	$R$	$L_Q$ [mol/L]
	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$-1,554 \pm 0,011$	$0,800 \pm 0,711$	$-0,9998$	-
DCV	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-1,564 \pm 0,014$	$-0,155 \pm 0,094$	$-0,9997$	-
	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$-1,841 \pm 0,015$	$-0,014 \pm 0,010$	$-0,9997$	$1,5 \cdot 10^{-7}$
	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$-1,269 \pm 0,013$	$1,253 \pm 0,864$	$-0,9996$	-
DPV	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-1,213 \pm 0,012$	$0,144 \pm 0,077$	$-0,9996$	-
	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$-0,925 \pm 0,006$	$0,010 \pm 0,004$	$-0,9998$	$2,3 \cdot 10^{-7}$

a - intervaly představující horní a dolní konfidenční limity ( $\alpha = 0,05$ )

b - úseky nejsou statisticky významně odlišné od nuly na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$

### Tabulka 3.6

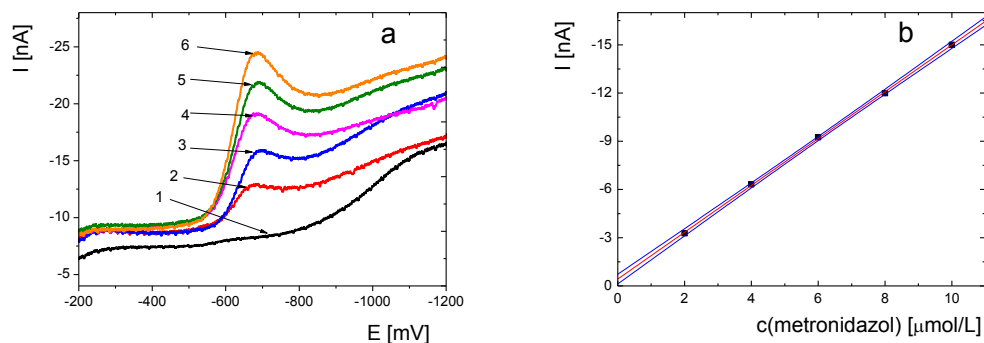
Statistické vyhodnocení opakovatelnosti měření ornidazolu pomocí DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) na m-AgSAE v prostředí BR pufru pH 8,0. Nejnižší koncentrace  $2 \cdot 10^{-7}$  mol/L, nejvyšší koncentrace  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L. Počet měření  $n = 10$ , hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ .

	$c$ [mol/L]	$\tilde{x}$ [nA]	$L_{1,2}$ [nA]	$s$ [nA]	$s_r$ [%]
DCV	$1 \cdot 10^{-4}$	-154,3	-1,1	-1,6	1,0
	$2 \cdot 10^{-7}$	-0,369	-0,019	-0,027	7,3
DPV	$1 \cdot 10^{-4}$	-125,9	-1,5	-2,1	1,7
	$2 \cdot 10^{-7}$	-0,172	-0,015	-0,021	12,2

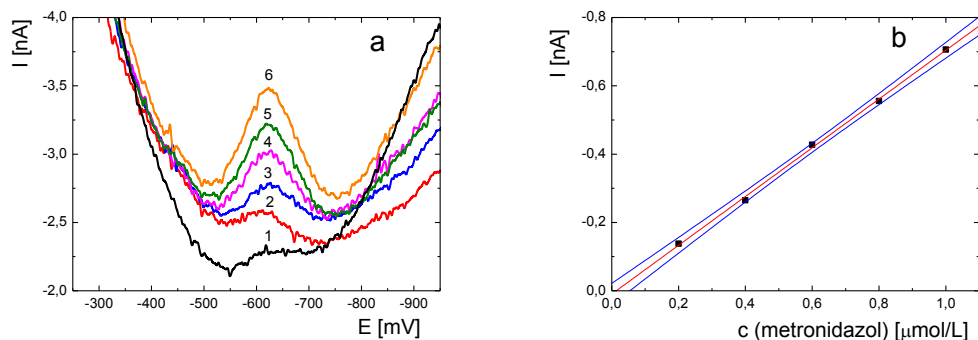
### 3.3 Aplikace DC voltametrie a DP voltametrie na modelových vzorcích pitné a říční vody

#### 3.3.1 Metronidazol

Chování metronidazolu bylo studováno metodami DCV a DPV ve vzorcích pitné a říční vody z Vltavy. Pro stanovení v obou vzorcích vody byly použity již zjištěné optimální podmínky, vodný roztok BR pufru o pH 8,0 a vložení regeneračních potenciálů ( $E_{in} = 150 \text{ mV}$ ,  $E_{fin} = -1600 \text{ mV}$ ) na m-AgSAE před každým měřením. Nezbytné bylo k měřeným roztokům přidat 100  $\mu\text{L}$  chelatonu III (CH.III) o koncentraci 0,1 mol/L pro vyvážení iontů kovů, které jsou ve vodách obsaženy do komplexu. Kalibrační závislosti byly sestrojeny v rozmezí koncentrací  $2 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-5}$  mol/L. Koncentrace  $2 \cdot 10^{-7}$  mol/L byla považována za nejnižší stanovitelnou, protože voltamogramy byly obtížně vyhodnotitelné. Pro ukázkou jsou na obr. 3.15 (a) uvedeny DC voltamogramy naměřené v pitné vodě v rozmezí koncentrací  $2 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-5}$  mol/L, na obr. 3.15 (b) je příslušná kalibrační přímka. Na obr. 3.16 (a) jsou DP voltamogramy metronidazolu naměřené v pitné vodě pro koncentrační řád  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/L a obr. 3.16 (b) uvádí příslušnou kalibrační přímku. Obr. 3.17 (a) znázorňuje DC voltamogramy naměřené v říční vodě pro koncentrační rozsah  $2 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-5}$  mol/L, na obr. 3.17 (b) je příslušná kalibrační přímka. 3.18 (a) uvádí DP voltamogramy v říční vodě v rozsahu koncentrací  $2 \cdot 10^{-7}$  mol/L až  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/L. Parametry jednotlivých kalibračních závislostí pro obě voltametrické metody jsou shrnuty v tabulce 3.7. V tabulce 3.8 je uvedena opakovatelnost metronidazolu v pitné a říční vodě DC voltametrií a DP voltametrií na m-AgSAE, nejnižší koncentrace  $2 \cdot 10^{-7}$  mol/L a nejvyšší koncentrace  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/L.

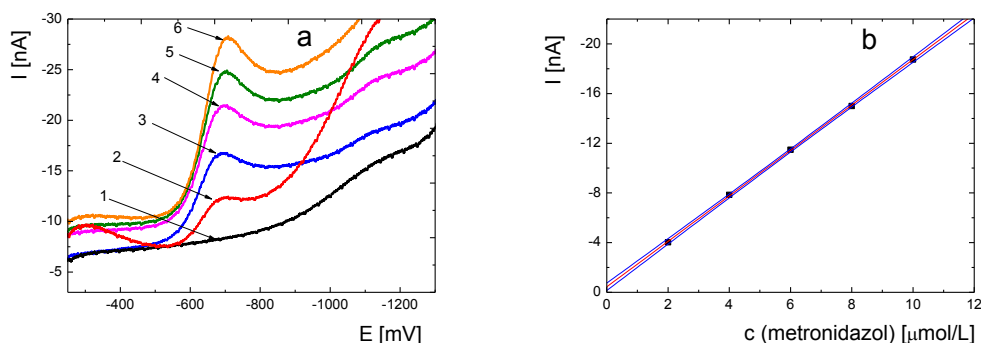


**Obr. 3.15** (a) DC voltamogramy metronidazolu v rozsahu koncentrací 2-10 µmol/L . Základní elektrolyt (1); koncentrace metronidazolu v µmol/L 2 (2); 4 (3); 6 (4); 8 (5); 10 (6). Měřeno v pitné vodě na m-AgSAE s aplikací regeneračních potenciálů:  $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1600$  mV, s přidavkem 0,1 mol/L CH III. Závislost proudu píku na koncentraci metronidazolu v rozsahu koncentrací 2-10 µmol/L, měřeno v pitné vodě DC voltametrií (b).

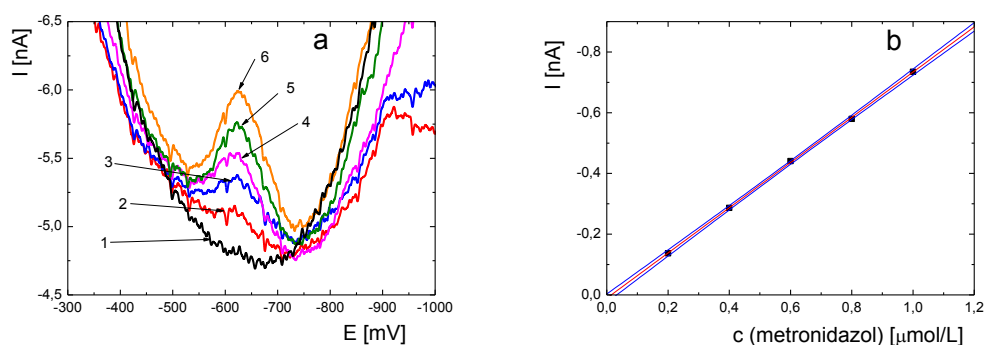


**Obr. 3.16** (a) DP voltamogramy metronidazolu v rozsahu koncentrací 0,2-1 µmol/L. Základní elektrolyt (1); koncentrace metronidazolu v µmol/L 0,2 (2); 0,4 (3); 0,6 (4); 0,8 (5); 1 (6). Měřeno v pitné vodě na m-AgSAE s aplikací regeneračních potenciálů:  $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1600$  mV, s přidavkem 0,1 mol/L CH III.

Závislost proudu píku na koncentraci metronidazolu v rozsahu koncentrací 0,2-1 µmol/L , měřeno v pitné vodě DP voltametrií (b).



**Obr. 3.17** (a) DC voltamogramy metronidazolu v rozsahu koncentrací 2-10  $\mu\text{mol/L}$ . Základní elektrolyt (1); koncentrace metronidazolu v  $\mu\text{mol/L}$  2 (2); 4 (3); 6 (4); 8 (5); 10 (6). Měřeno v říční vodě na m-AgSAE s aplikací regeneračních potenciálů:  $E_{\text{in}} = 150 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{fin}} = -1600 \text{ mV}$  s přidavkem 0,1 mol/L CH III. Závislost proudu píku na koncentraci metronidazolu v rozsahu koncentrací 2-10  $\mu\text{mol/L}$ , měřeno v říční vodě DC voltametří (b).



**Obr. 3.18** (a) DP voltamogramy metronidazolu v rozsahu koncentrací 0,2-1  $\mu\text{mol/L}$ . Základní elektrolyt (1); koncentrace metronidazolu v  $\mu\text{mol/L}$  0,2 (2); 0,4 (3); 0,6 (4); 0,8 (5); 1 (6). Měřeno v říční vodě na m-AgSAE s aplikací regeneračních potenciálů:  $E_{\text{in}} = 150 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{fin}} = -1600 \text{ mV}$  s přidavkem 0,1 mol/L CH III.

Závislost proudu píku na koncentraci metronidazolu v rozsahu koncentrací 0,2-1  $\mu\text{mol/L}$ , měřeno v říční vodě DP voltametří (b).

### Tabulka 3.7

Parametry kalibračních přímk pro stanovení metronidazolu v pitné a říční vodě DC voltametří a DP voltametří na m-AgSAE ve vodném prostředí BR pufru o pH 8,0 s přidavkem 100  $\mu$ L chelatonu III a aplikací regeneračních potenciálů před každým měřením:  $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1600$  mV.

Vzorek	Metoda	$c$ [mol/L]	Směrnice <sup>a</sup> [mA·L/mol]	Úsek <sup>b</sup> [nA]	$R$	$L_Q$ [mol/L]
Pitná voda	DCV	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-1,457 \pm 0,014$	$-0,430 \pm 0,095$	$-0,9996$	-
		$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$-0,989 \pm 0,015$	$-0,029 \pm 0,010$	$-0,9911$	$2,1 \cdot 10^{-7}$
	DPV	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-1,088 \pm 0,007$	$-0,242 \pm 0,040$	$-0,9999$	-
		$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$-0,714 \pm 0,015$	$0,010 \pm 0,010$	$-0,9983$	$2,5 \cdot 10^{-7}$
Říční voda	DCV	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-1,828 \pm 0,014$	$-0,440 \pm 0,090$	$-0,9998$	-
		$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$-1,614 \pm 0,031$	$-0,019 \pm 0,020$	$-0,9986$	$2,0 \cdot 10^{-7}$
	DPV	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-1,185 \pm 0,007$	$-0,140 \pm 0,046$	$-0,9999$	-
		$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$-0,745 \pm 0,007$	$0,011 \pm 0,004$	$-0,9997$	$2,4 \cdot 10^{-7}$

a – intervaly představující horní a dolní konfidenční limity ( $\alpha = 0,05$ )

b – úseky nejsou statisticky významně odlišné od nuly na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$



### Tabulka 3.8

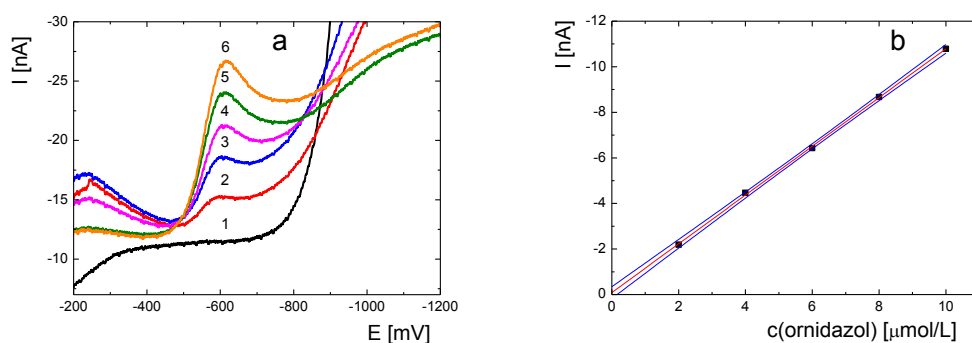
Statistické vyhodnocení opakovatelnosti metronidazolu ve vzorcích pitné a říční vody metodami DCV a DPV na m-AgSAE pro nejnižší koncentraci  $2 \cdot 10^{-7}$  mol/L a nejvyšší koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/L ve vodném prostředí BR pufru s přidavkem 100  $\mu$ l chelatonu III o pH 8,0; počet měření  $n = 10$ , hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Vzorek	Metoda	$c$ [mol/L]	$\tilde{x}$ [nA]	$L_{1,2}$ [nA]	$s$ [nA]	$s_r$ [%]
Pitná voda	DCV	$1 \cdot 10^{-5}$	-15,10	-0,15	-0,21	1,4
		$2 \cdot 10^{-7}$	-0,232	-0,015	-0,021	9,2
	DPV	$1 \cdot 10^{-5}$	-10,55	-0,11	-0,15	1,4
		$2 \cdot 10^{-7}$	-0,093	-0,013	-0,018	19,6
Říční voda	DCV	$1 \cdot 10^{-5}$	-17,47	-0,11	-0,16	0,89
		$2 \cdot 10^{-7}$	-0,365	-0,023	-0,033	8,9
	DPV	$1 \cdot 10^{-5}$	-11,993	-0,039	-0,006	0,46
		$2 \cdot 10^{-7}$	-0,131	-0,013	-0,018	13,6

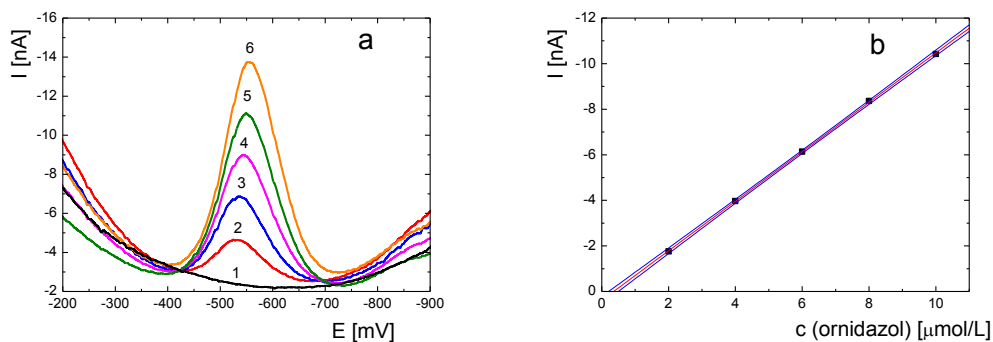
### 3.3.2 Ornidazol

Analogicky jako pro metronidazol bylo sledováno chování ornidazolu ve vzorcích pitné a říční vody z Vltavy metodami DCV a DPV. Pro měření ornidazolu v reálných vzorcích vod byly použity zjištěné optimální podmínky, vodný roztok BR pufru o pH 8,0 přídavek 100  $\mu\text{L}$  chelatonu III (CH III) o koncentraci 0,1 mol/L pro vyvázání iontů kovů přítomných ve vzorcích vod do komplexu a vložení regeneračních potenciálů na m-AgSAE: ( $E_{\text{in}} = 50 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{fin}} = -1500 \text{ mV}$ ) před každým měřením.

Kalibrační roztoky byly zvoleny v rozsahu koncentrací ornidazolu  $2 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-5}$  mol/L. Pro ukázkou jsou na obr. 3.19 (a) uvedeny DC voltamogramy naměřené v pitné vodě v rozmezí koncentrací  $2 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-5}$  mol/L, na obr. 3.19 (b) je příslušná kalibrační přímka. Na obr. 3.20 (a) jsou DP voltamogramy ornidazolu naměřené v pitné vodě v rozsahu koncentrací  $2 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-5}$  mol/L a obr. 3.20 (b) uvádí příslušnou kalibrační přímku. Obr. 3.21 (a) znázorňuje DC voltamogramy naměřené v říční vodě v rozmezí koncentrací  $2 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-5}$  mol/L a na obr. 3.21 (b) je kalibrační přímka pro tuto závislost. Obr. 3.22 (a) uvádí DP voltamogramy v říční vodě ve stejném koncentračním řádu ( $2 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-5}$  mol/L). Charakteristiky kalibračních závislostí byly shrnuty v tabulce 3.9. Údaje o statistickém vyhodnocení opakovatelnosti ornidazolu ve vzorcích pitné a říční vody zahrnuje tabulka 3.10.

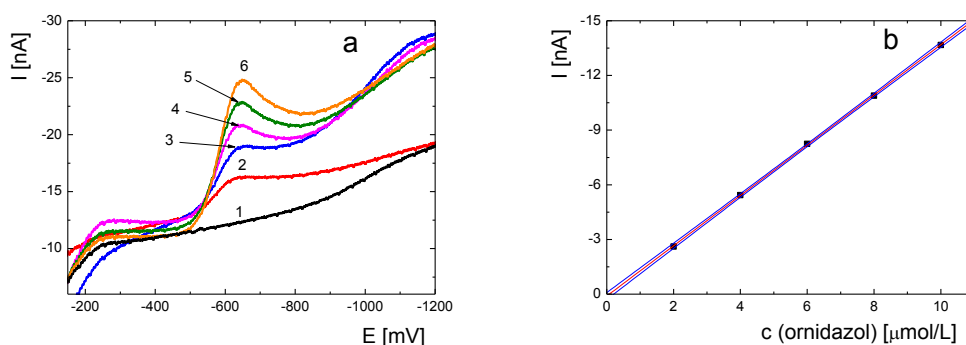


**Obr. 3.19** (a) DC voltamogramy ornidazolu v rozsahu koncentrací 2-10  $\mu\text{mol/L}$ . Základní elektrolyt (1); koncentrace ornidazolu v  $\mu\text{mol/L}$  2 (2); 4 (3); 6 (4); 8 (5); 10 (6). Měřeno v pitné vodě na m-AgSAE s aplikací regeneračních potenciálů:  $E_{\text{in}} = 150 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{fin}} = -1600 \text{ mV}$  s přídavkem 0,1 mol/L CH III. Závislost proudu píku na koncentraci ornidazolu v rozsahu koncentrací 2-10  $\mu\text{mol/L}$ , měřeno v pitné vodě DC voltametří (b).



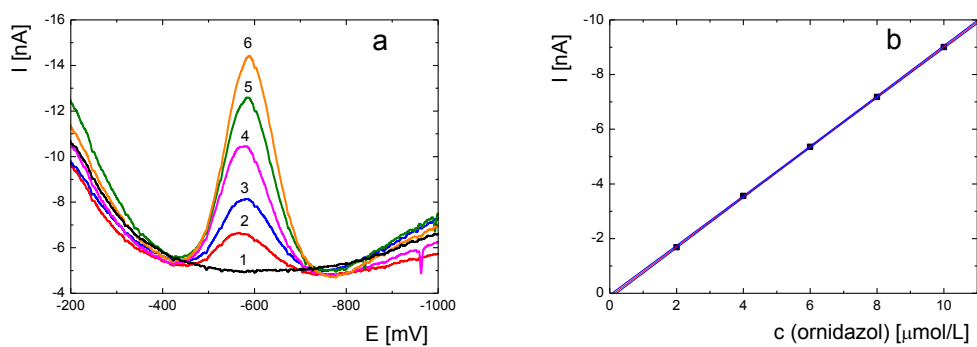
**Obr. 3.20** (a) DP voltamogramy ornidazolu v rozsahu koncentrací 2-10  $\mu\text{mol/L}$ . Základní elektrolyt (1); koncentrace ornidazolu v  $\mu\text{mol/L}$  2 (2); 4 (3); 6 (4); 8 (5); 10 (6). Měřeno v pitné vodě na m-AgSAE s aplikací regeneračních potenciálů:  $E_{\text{in}} = 150 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{fin}} = -1600 \text{ mV}$  s přidavkem 0,1 mol/L CH III.

Závislost proudu píku na koncentraci ornidazolu v rozsahu koncentrací 2-10  $\mu\text{mol/L}$ , měřeno v pitné vodě DP voltametří (b).



**Obr. 3.21** (a) DC voltamogramy ornidazolu v rozsahu koncentrací 2-10  $\mu\text{mol/L}$ . Základní elektrolyt (1); koncentrace ornidazolu v  $\mu\text{mol/L}$  2 (2); 4 (3); 6 (4); 8 (5); 10 (6). Měřeno v říční vodě na m-AgSAE s aplikací regeneračních potenciálů:  $E_{\text{in}} = 150 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{fin}} = -1600 \text{ mV}$  s přidavkem 0,1 mol/L CH III.

Závislost proudu píku na koncentraci ornidazolu v rozsahu koncentrací 2-10  $\mu\text{mol/L}$ , měřeno v říční vodě DC voltametří (b).



**Obr. 3.19** (a) DP voltamogramy ornidazolu v rozsahu koncentrací 2-10  $\mu\text{mol/L}$ . Základní elektrolyt (1); koncentrace ornidazolu v  $\mu\text{mol/L}$  2 (2); 4 (3); 6 (4); 8 (5); 10 (6). Měřeno v říční vodě na m-AgSAE s aplikací regeneračních potenciálů:  $E_{\text{in}} = 150 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{fin}} = -1600 \text{ mV}$  s přidavkem 0,1 mol/L CH III. Závislost proudu píku na koncentraci ornidazolu v rozsahu koncentrací 2-10  $\mu\text{mol/L}$ , měřeno v říční vodě DP voltametrií (b).

**Tabulka 3.9**

Charakteristiky kalibračních přímek stanovení ornidazolu v reálných vzorcích pitné a říční vody metodami DCV a DPV na m-AgSAE ve vodném prostředí BR pufru o pH 8,0 s přidavkem 100  $\mu$ L chelatonu III. a regeneračním krokem ( $E_{in} = 50$  mV,  $E_{fin} = -1500$  mV) před každým měřením.

Vzorek	Metoda	$c$ [mol/L]	Směrnice <sup>a</sup> [mA·L/mol]	Úsek <sup>b</sup> [nA]	$R$	$L_Q$ [mol/L]
Pitná voda	DCV	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-1,070 \pm 0,012$	$-0,088 \pm 0,081$	$-0,9995$	-
		$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$-1,200 \pm 0,098$	$-0,082 \pm 0,006$	$-0,9997$	$2,3 \cdot 10^{-7}$
	DPV	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-1,086 \pm 0,008$	$0,384 \pm 0,052$	$-0,9998$	-
		$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$-0,560 \pm 0,005$	$-0,014 \pm 0,033$	$-0,9997$	$2,4 \cdot 10^{-7}$
Říční voda	DCV	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-1,379 \pm 0,009$	$0,103 \pm 0,060$	$-0,9998$	-
		$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$-1,256 \pm 0,018$	$-0,010 \pm 0,012$	$-0,9992$	$2,0 \cdot 10^{-7}$
	DPV	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	$-0,913 \pm 0,003$	$0,120 \pm 0,020$	$-0,9999$	-
		$(2-10) \cdot 10^{-7}$	$-0,524 \pm 0,007$	$0,020 \pm 0,045$	$-0,9993$	$2,0 \cdot 10^{-7}$

a - intervaly představující horní a dolní konfidenční limity ( $\alpha = 0,05$ )

b - úseky nejsou statisticky významně odlišné od nuly na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$

### Tabulka 3.10

Statistické vyhodnocení opakovatelnosti měření ornidazolu pomocí metod DCV a DPV ve vzorcích pitné a říční vody, naměřené na m-AgSAE pro nejnižší koncentraci  $2 \cdot 10^{-7}$  mol/L a nejvyšší koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/L ve vodném prostředí BR pufru o pH 8,0 s přidavkem 100  $\mu$ l chelatonu III.; počet měření  $n = 10$ , hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Vzorek	Metoda	$c$ [mol/L]	$\tilde{x}$ [nA]	$L_{1,2}$ [nA]	$s$ [nA]	$s_r$ [%]
Pitná voda	DCV	$1 \cdot 10^{-5}$	-10,56	-0,14	-0,20	1,9
		$2 \cdot 10^{-7}$	-0,292	-0,019	-0,028	9,6
	DPV	$1 \cdot 10^{-5}$	-10,46	-0,14	-0,20	1,9
		$2 \cdot 10^{-7}$	-0,1926	-0,0095	-0,0135	7,0
Říční voda	DCV	$1 \cdot 10^{-5}$	-13,45	-0,11	-0,15	1,1
		$2 \cdot 10^{-7}$	-0,410	-0,018	-0,025	6,2
	DPV	$1 \cdot 10^{-5}$	-9,200	-0,072	-0,101	1,1
		$2 \cdot 10^{-7}$	-0,0911	-0,0075	-0,0106	11,7

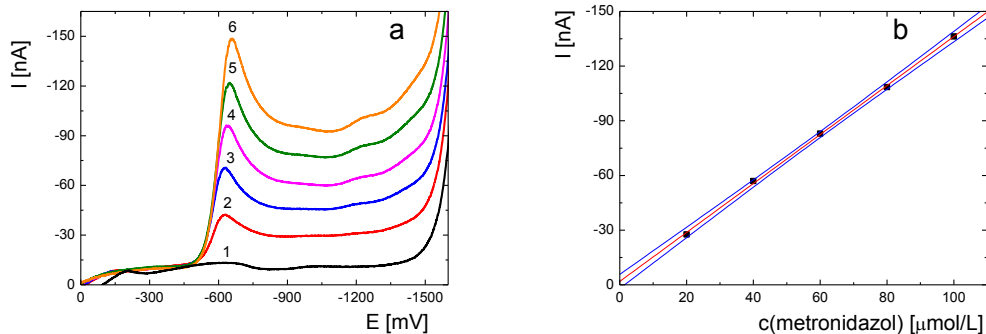
### 3.4 Voltametrické stanovení obsahu metronidazolu v léčivech

Množství metronidazolu bylo studováno v následujících léčivech. Infuzní roztok - Efloran obsahoval 500 mg metronidazolu na 100 mL roztoku, tablety Entizol, které obsahovaly 250 mg metronidazolu v 1 tabletě a vaginální tablety Entizol, obsahující 500 mg metronidazolu v jedné vaginální tabletě. K voltametrickému měření bylo odpipetováno vhodné množství, které bylo doplněno BR pufrům o pH 8,0.

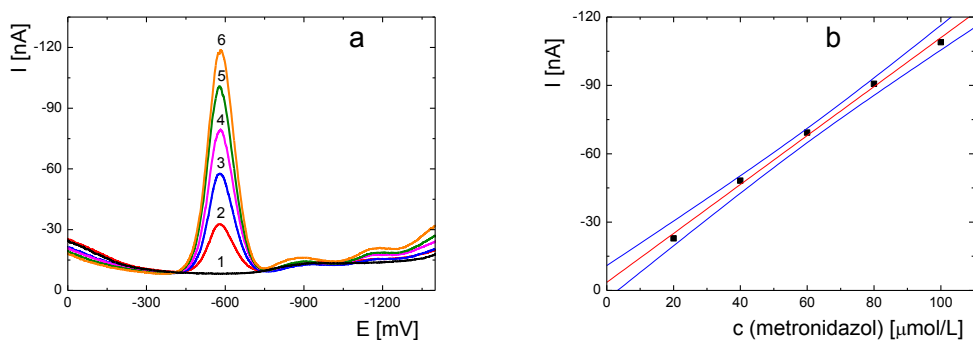
#### 3.4.1 Metoda kalibrační přímky

Pro každé léčivo byly sestrojeny kalibrační závislosti v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-5}$ - $10 \cdot 10^{-5}$  mol/L. Vzorek léčiva byl naředěn tak, aby ležel uprostřed kalibrační závislosti. Množství léčiva bylo vypočteno z rovnice regrese. Obsah metronidazolu byl stanoven DC voltametrií (DCV) a diferenční pulzní voltametrií (DPV). Z předchozích studií byly použity vhodné podmínky, vodný roztok BR pufru o pH 8,0 a vložení regeneračních potenciálů před každým měřením na m-AgSAE:  $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1600$  mV.

Pro ukázkou je získaná koncentrační závislost pro Entizol tablety metodou DCV uvedena na obr. 3.23 (a) a závislost proudu píku na koncentraci pro tuto metodu je na obr. 3.23 (b). Na obr. 3.24 (a) jsou DP voltamogramy pro tabletu Entizolu a příslušná kalibrační přímka je zobrazena na obr. 3.24 (b). Parametry kalibračních přímek pro stanovení metronidazolu v léčivech metodami DCV i DPV jsou shrnuty v tabulce 3.11, tabulka 3.12 uvádí vypočtený obsah metronidazolu v daných léčivech.



**Obr. 3.23** (a) DC voltamogramy metronidazolu v rozsahu koncentrací 20-100  $\mu\text{mol/L}$ . Základní elektrolyt (1); koncentrace metronidazolu v  $\mu\text{mol/L}$  20 (2); 40 (3); 60 (4); 80 (5); 100 (6). Měřeno ve vodném roztoku BR pufru o pH 8,0 na m-AgSAE s aplikací regeneračních potenciálů:  $E_{\text{in}} = 150 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{fin}} = -1600 \text{ mV}$ . Závislost proudu píku na koncentraci metronidazolu v koncentračním rozmezí 20-100  $\mu\text{mol/L}$ . Měřeno DC voltametří na m-AgSAE. Uvedená kalibrační přímka pro stanovení obsahu metronidazolu v tabletách Entizolu (b).



**Obr. 3.24** (a) DP voltamogramy metronidazolu v rozsahu koncentrací 20-100  $\mu\text{mol/L}$ . Základní elektrolyt (1); koncentrace metronidazolu v  $\mu\text{mol/L}$  20 (2); 40 (3); 60 (4); 80 (5); 100 (6). Měřeno ve vodném roztoku BR pufru o pH 8,0 na m-AgSAE s aplikací regeneračních potenciálů:  $E_{\text{in}} = 150 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{fin}} = -1600 \text{ mV}$ . Závislost proudu píku na koncentraci metronidazolu v koncentračním rozmezí 20-100  $\mu\text{mol/L}$ . Měřeno DP voltametří na m-AgSAE. Uvedená kalibrační přímka pro stanovení obsahu metronidazolu v tabletách Entizolu (b).



**Tabulka 3.11**

Parametry kalibračních přímek pro stanovení metronidazolu v léčivech DC voltametrií a DP voltametrií na m-AgSAE ve vodném prostředí BR pufru o pH 8,0. S aplikací regeneračních potenciálů:  $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1600$  mV.

Metoda	Léčivo	$c$ [mol/L]	Směrnice <sup>a</sup> [mA·L/mol]	Úsek <sup>b</sup> [nA]	$R$
	Efloran - infuzní roztok	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$-1,305 \pm 0,020$	$0,087 \pm 1,307$	$-0,9991$
DCV	Entizol tablety	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$-1,470 \pm 0,016$	$2,7 \pm 1,1$	$-0,9995$
	Entizol vaginální tablety	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$-1,343 \pm 0,018$	$-1,9 \pm 1,2$	$-0,9993$
	Efloran - infuzní roztok	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$-1,105 \pm 0,010$	$0,95 \pm 0,65$	$-0,9997$
DPV	Entizol tablety	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$-1,189 \pm 0,010$	$2,1 \pm 0,7$	$-0,9997$
	Entizol vaginální tablety	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$-1,074 \pm 0,035$	$-3,6 \pm 2,3$	$-0,9958$

a - intervaly představující horní a dolní konfidenční limity ( $\alpha = 0,05$ )

b - úseky nejsou statisticky významně odlišné od nuly na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$

**Tabulka 3.12**

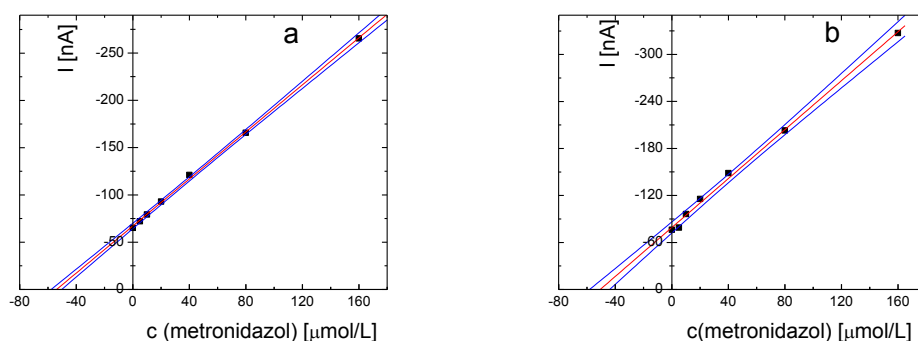
Vypočtený obsah metronidazolu v léčivech DC voltametří a diferenční pulzní voltametří na m-AgSAE ve vodném prostředí BR pufru o pH 8,0 metodou kalibrační přímky; počet měření  $n = 3$ , hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Metoda	Léčivo	$m$ vypočtené [mg]	$m$ deklarované [mg]	$w$ [%]
DCV	Efloran-infuzní roztok	490,5±23,9	500	98
	Entizol-tbl.	214,2±41,0	250	86
	Entizol-vag.tbl.	445,5±56,8	500	89
DPV	Efloran-infuzní roztok	461,9±36,2	500	92
	Entizol-tbl.	210,3±25,6	250	84
	Entizol-vag.tbl.	474,4±31,3	500	95

### 3.4.2 Metoda standardního přídatku

Obsah metronidazolu v léčivech byl stanoven metodou standardního přídatku. Při této kalibrační metodě se standardní vzorek přidává přímo do vzorku s hledanou koncentrací. Roztoky analyzovaného vzorku i vzorků se standardním přídatkem byly připraveny v odměrných baňkách 10 mL. Nejprve byl proměřen roztok obsahující pouze analyzovaný vzorek a následně roztoky s vhodně zvolenými přídatky zásobního roztoku metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/L), aby bylo koncentrační rozmezí  $5 \cdot 10^{-6}$ - $1,6 \cdot 10^{-4}$  mol/L.<sup>67</sup>

Hodnoty byly vyhodnoceny a následně zpracovány do formy kalibračních grafů. Pro ukázkou je na obr. 3.25 (a) závislost proudu píku na koncentraci metronidazolu v rozmezí koncentrací  $5 \cdot 10^{-6}$ - $1,6 \cdot 10^{-4}$  mol/L naměřená metodou DCV a stejná závislost pro DPV je uvedena na obr. 3.25 (b) Oba grafy jsou pro infuzní roztok – Efloran. V tabulce 3.13 jsou shrnuty parametry kalibračních grafů pro daná léčiva. Z parametrů kalibračních grafů byla vypočtena hmotnost metronidazolu v léčivech, která je uvedena v tabulce 3.14.



**Obr. 3.25** Závislost proudu píku na koncentraci metronidazolu v koncentračním rozmezí 5-160  $\mu\text{mol/L}$ . Měřeno DC voltmetrií (a), DP voltmetrií (b) na m-AgSAE. Uvedené přímky jsou pro infuzní roztok - Efloran. Kalibrace provedena metodou standardního přídatku.

### Tabulka 3.13

Charakteristiky přímek pro stanovení metronidazolu v léčivech DC voltametrií a diferenční pulzní voltametrií na m-AgSAE ve vodném prostředí BR pufru o pH 8,0; metoda standardního přídatku. S aplikací regeneračních potenciálů:  $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1600$  mV.

Metoda	Léčivo	$c$ [mol/L]	Směrnice <sup>a</sup> [mA·L/mol]	Úsek <sup>b</sup> [nA]	$R$
DCV	Efloran infuzní roztok	$5 \cdot 10^{-6}$ - $1,6 \cdot 10^{-4}$	$-1,513 \pm 0,022$	$-84,5 \pm 1,7$	$-0,9990$
	Entizol tablety	$5 \cdot 10^{-6}$ - $1,6 \cdot 10^{-4}$	$-1,512 \pm 0,031$	$-65,9 \pm 2,2$	$-0,9975$
	Entizol vaginální tablety	$5 \cdot 10^{-6}$ - $1,6 \cdot 10^{-4}$	$-1,413 \pm 0,018$	$-70,5 \pm 1,3$	$-0,9990$
DPV	Efloran infuzní roztok	$5 \cdot 10^{-6}$ - $1,6 \cdot 10^{-4}$	$-1,561 \pm 0,039$	$-79,1 \pm 2,7$	$-0,9962$
	Entizol tablety	$5 \cdot 10^{-6}$ - $1,6 \cdot 10^{-4}$	$-1,222 \pm 0,020$	$-54,5 \pm 1,3$	$-0,9986$
	Entizol vaginální tablety	$5 \cdot 10^{-6}$ - $1,6 \cdot 10^{-4}$	$-1,176 \pm 0,011$	$-58,0 \pm 0,8$	$-0,9994$

a - intervaly představující horní a dolní konfidenční limity ( $\alpha = 0,05$ )

b - úseky nejsou statisticky významně odlišné od nuly na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$

**Tabulka 3.14**

Obsah metronidazolu v léčivech DC voltametrií a diferenční pulzní voltametrií na m-AgSAE ve vodném prostředí BR pufru o pH 8,0, metoda standardního přídatku

Metoda	Léčivo	$m$ vypočtené [mg]	$m$ deklarované [mg]	w [%]
DCV	Efloran-infuzní roztok	478	500	96
	Entizol-tableta	186	250	75
	Entizol-vaginální tableta	427	500	85
DPV	Efloran-infuzní roztok	434	500	87
	Entizol-tableta	191	250	76
	Entizol-vaginální tableta	422	500	84

## 4. Cyklická voltametrie

Cyklickou voltametrií lze sledovat elektrochemické mechanismy. Nitro skupina 5 nitroimidazolových derivátů nejlépe poskytuje elektrony. Redukuje se za uvolnění čtyř elektronů za vzniku hydroxylaminu.<sup>68</sup>

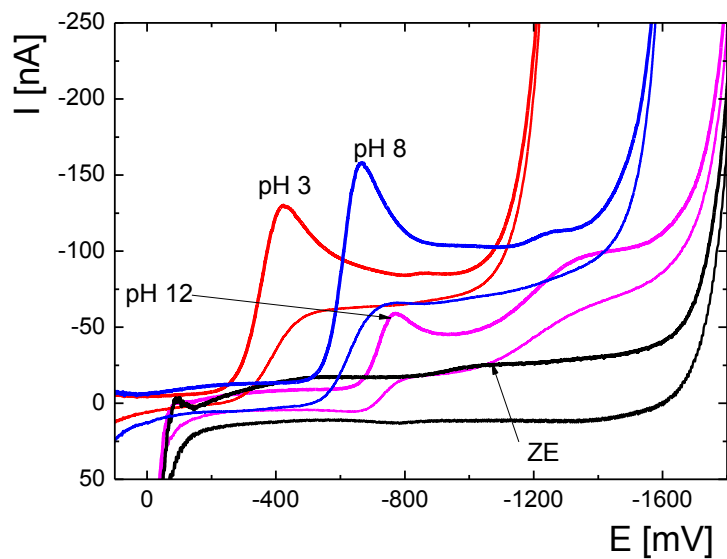
Voltametrické studie nitroimidazolových derivátů ukázaly, že se ve vodných roztocích při zásaditém pH objevují dva píky při redukci látky. První odpovídá redukci na hydroxylamin a druhý následné redukci na aminoderivát.

Následující studie dokázaly, že redukční mechanismus daných látek je závislý na rozpouštědlech a vratný krok závisí na substituovaných skupinách na heterocyklickém nitroimidazolovém kruhu.<sup>69</sup>

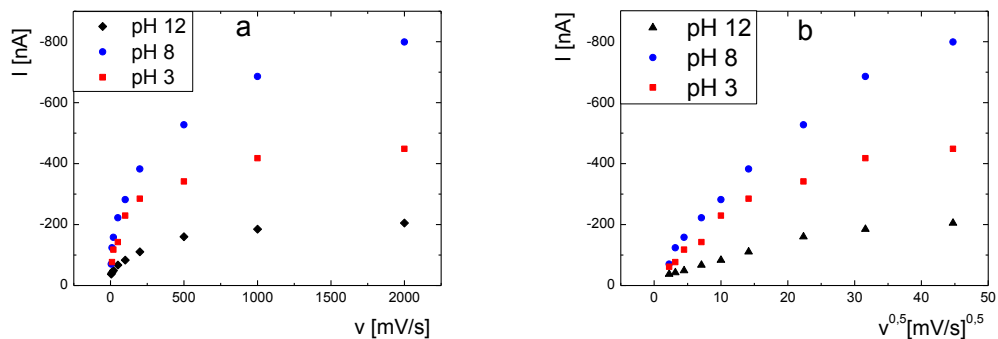
### 4.1 Metronidazol

Chování metronidazolu bylo studováno cyklickou voltametrií na m-AgSAE. Byly zvoleny pH BR pufru v kyselé oblasti, v neutrální oblasti a pH v oblasti zásadité. Při těchto pH byly následně proměřeny cyklické voltamogramy v rozmezí rychlostí nárůstu potenciálu 5-2000 mV/s. Metronidazol měl v roztocích koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L. Na m-AgSAE byly vloženy regenerační potenciály před každým měřením:  $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1600$  mV.

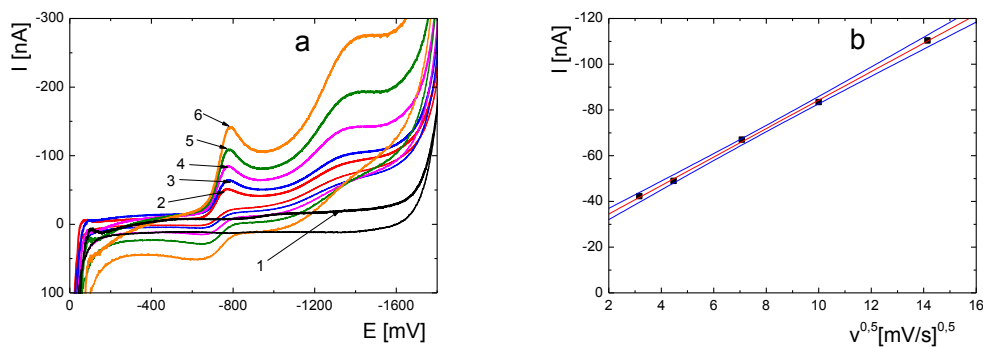
Při kyselém pH a pH v neutrální oblasti metronidazol poskytoval jeden voltametrický pík při jeho redukci. Při zásaditém pH se objevil i druhý pík. Cyklické voltamogramy metronidazolu při všech studovaných pH jsou uvedeny na obr. 4.1. Ve zpětném scanu se neobjevil u kyselého a neutrálního pH vyhodnotitelný pík, proto lze usoudit, že se jednalo o ireversibilní děj. Při zásaditém pH se ve zpětném scanu pík objevil, proto je zřejmé, že se jednalo o částečně reversibilní děj. Následně byly cyklické voltamogramy vyhodnoceny a do grafu vynesena závislost proudu píku metronidazolu na rychlosti nárůstu potenciálu obr. 4.2 (a) a obr. 4.2 (b) znázorňuje závislost velikosti proudu píku na druhé odmocnině z rychlosti nárůstu potenciálu. Z obrázků je patrné, že při nižších rychlostech a zásaditém pH je závislost lineární, ale úsek na ose y není zanedbatelný. Na obr. 4.3 (a) jsou cyklické voltamogramy metronidazolu v rozsahu rychlostí 10-200 mV/s, na obr. 4.3 (b) je závislost proudu píku metronidazolu na druhé odmocnině rychlosti. V tabulce 4.1 jsou parametry kalibrační přímky.



**Obr. 4.1** Cyklické voltamogramy metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) v BR pufru o pH 3,0; 8,0 a 12,0 při rychlosti nárůstu potenciálu: 20 mV/s, naměřené na m-AgSAE s aplikací regeneračních potenciálů:  $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1600$  mV.



**Obr. 4.2** Závislost proudu píku metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) na rychlosti nárůstu potenciálu (a), na odmocnině rychlosti nárůstu potenciálu (b).



**Obr. 4.3** (a) Cyklické voltamogramy metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) v BR pufru o pH 12,0 při rychlostech nárůstu potenciálů: 10 (2), 20 (3), 50 (4), 100 (5), 200 (6). Křivka (1) znázorňuje základní elektrolyt při rychlosti 50 mV/s.

Závislost velikosti proudu píku  $I$  na druhé odmocnině z rychlosti nárůstu potenciálu  $v$ . Měřeno v BR pufru o pH 12,0 a aplikací regeneračních potenciálů:  $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1600$  mV (b).

#### Tabulka 4.1

Charakteristiky lineární závislosti velikosti proudu píku metronidazolu na druhé odmocnině z rychlosti nárůstu potenciálu na m-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 12,0.

$v$ [mV/s]	Směrnice <sup>a</sup> [nA·mV <sup>-0,5</sup> s <sup>0,5</sup> ]	Úsek <sup>b</sup> [nA]	$R$
10-200	-6,23±0,11	-22,04±0,97	-0,9987

a - intervaly představující horní a dolní konfidenční limity ( $\alpha = 0,05$ )

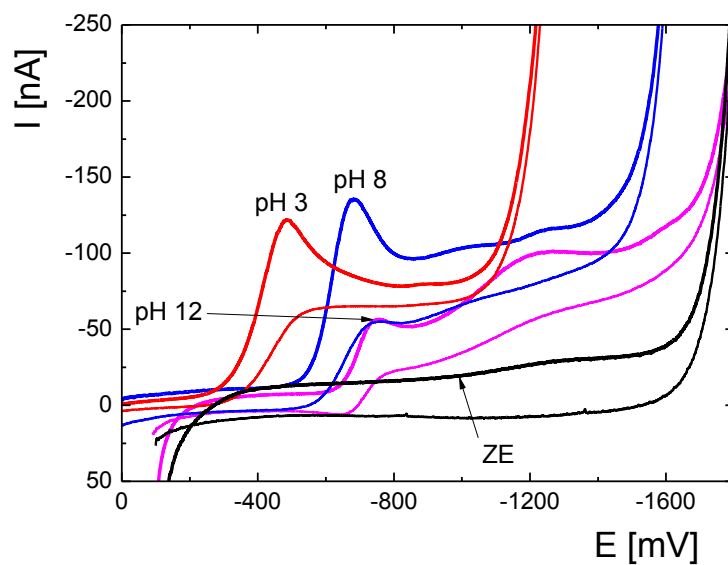
b - úseky nejsou statisticky významně odlišné od nuly na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$



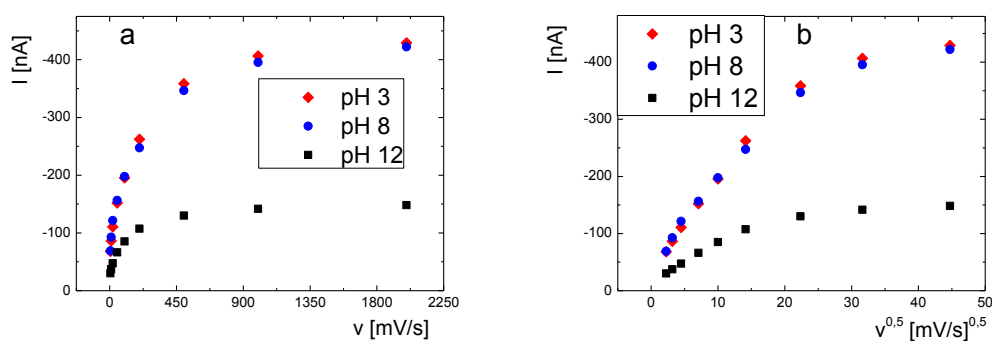
## 4.2 Ornidazol

Cyklickou voltametrií bylo zjištěno chování ornidazolu ve vodných roztocích BR pufru o třech různých pH z oblasti kyselé, neutrální a zásadité. Při každém pH byly proměřeny cyklické voltamogramy s proměnnou rychlostí nárůstu potenciálu od 5 mV/s do 2000 mV/s. Koncentrace ornidazolu v roztocích byla  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L. Na m-AgSAE byly vkládány regenerační potenciály před každým měřením:  $E_{in} = 50$  mV,  $E_{fin} = -1500$  mV.

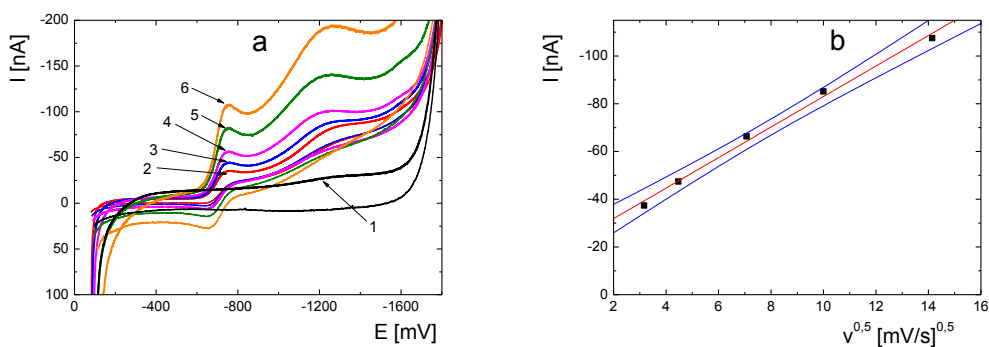
Při zvolených pH v kyselé a neutrální oblasti ornidazol poskytoval jeden voltametrický pík při jeho redukci. Ve zpětném scanu se neobjevil vyhodnotitelný pík, proto lze usoudit, že se jednalo o ireversibilní děj. Při pH 12,0 se objevily v katodické oblasti dva píky. Došlo nejprve k redukci na aminonitroradikál a následně na aminoderivát a při zpětném scanu se objevil pík, což značí částečně reversibilní děj. Na obr. 4.4. jsou cyklické voltamogramy ornidazolu při třech různých pH BR pufru. Následně byly cyklické voltamogramy vyhodnoceny a do grafu vynesena závislost proudu píku ornidazolu na rychlosti nárůstu potenciálu obr. 4.5 (a), obr. 4.5 (b) znázorňuje závislost velikosti proudu píku na druhé odmocnině z rychlosti nárůstu potenciálu. Z těchto závislostí vyplývá, že při nízkých rychlostech a zásaditém pH proudová odezva lineárně vzrůstá, což znamená, že děj je při nízkých rychlostech řízený difuzí. Na obr. 4.6 (a) jsou uvedeny cyklické voltamogramy ornidazolu při pH 12,0 v rozmezí rychlostí 10 až 200 mV/s. Obr. 4.6 (b) uvádí závislost proudu píku na druhé odmocnině z rychlosti nárůstu potenciálu. V tabulce 4.2 jsou charakteristiky kalibrační přímky.



**Obr. 4.4** Cyklické voltamogramy ornidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) v BR pufru o pH 3,0; 8,0 a 12,0 při rychlosti nárůstu potenciálu: 20 mV/s, měřeno na m-AgSAE s aplikací regeneračního kroku:  $E_{in} = 50$  mV,  $E_{fin} = -1500$  mV.



**Obr. 4.5** Závislost proudu píku ornidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) na rychlosti nárůstu potenciálu (a) a na odmocnině rychlosti nárůstu potenciálu (b).



**Obr. 4.6** (a) Cyklické voltamogramy ornidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) v BR pufru o pH 12,0 při rychlostech nárůstu potenciálů (mV/s): 10 (2), 20 (3), 50 (4), 100 (5), 200 (6). Základní elektrolyt při rychlosti 50 mV/s (1).

Závislost velikosti proudu  $I$  na druhé odmocnině z rychlosti nárůstu potenciálu  $v$ .(b)

#### Tabulka 4.2

Parametry lineární závislosti velikosti proudu píku na druhé odmocnině z rychlosti nárůstu potenciálu při CV ornidazolu na m-AgSAE v BR pufru o pH 12,0.

$v$ [mV/s]	Směrnice <sup>a</sup> [nA·mV <sup>-0,5</sup> ·s <sup>0,5</sup> ]	Úsek <sup>b</sup> [nA]	$R$
10-200	-6,40±0,27	-19,07±2,34	-0,9981

a - intervaly představující horní a dolní konfidenční limity ( $\alpha = 0,05$ )

b - úseky nejsou statisticky významně odlišné od nuly na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$

## 5. UV-VIS spektrofotometrické stanovení metronidazolu a ornidazolu (srovnávací metoda)

Pro porovnání voltametrického stanovení metronidazolu a ornidazolu byla zvolena UV-VIS absorpční spektrofotometrie. Vhodným ředěním byly připraveny škály kalibračních roztoků obou studovaných látek v rozmezí koncentrací od  $2 \cdot 10^{-7}$  mol/L do  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L. Roztoky byly připraveny odpipetováním příslušného množství látek ze zásobních roztoků a doplněny deionizovanou vodou do 10 mL odměrných baněk.

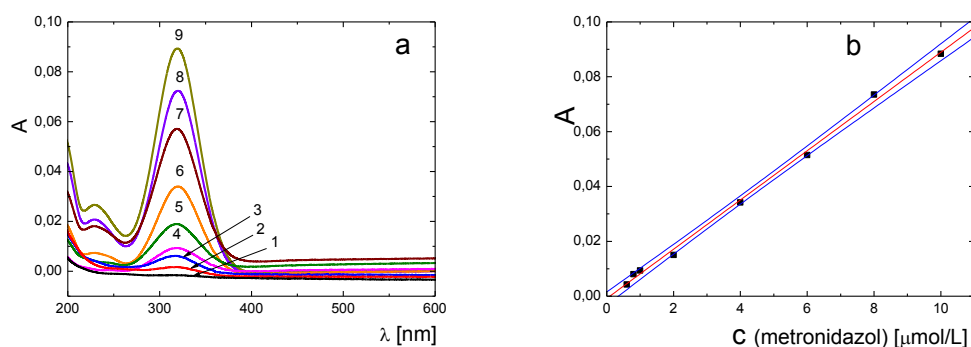
Absorbance připravených roztoků byla měřena na přístroji Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA), ovládané programem UV-Visible Chem Station.

Roztoky byly měřené v křemenné kyvetě o optické délce 1 cm proti deionizované vodě v rozsahu vlnových délek 200-800 nm. Všechny křivky byly měřeny třikrát. Jako nejnižší koncentrace byla u obou studovaných látek považována  $6 \cdot 10^{-7}$  mol/L. Tato koncentrace byla změřena desetkrát, stejně jako nejvyšší koncentrace  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L.

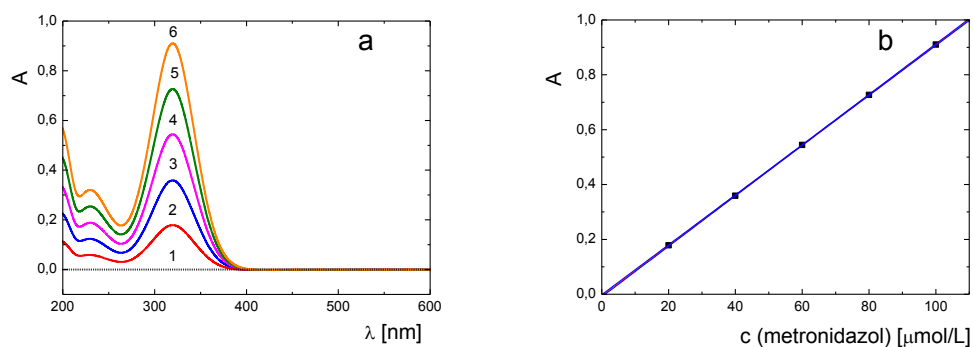
Na obr. 5.1 (a) jsou uvedeny absorpční spektra metronidazolu v rozmezí koncentrací 0,6-10  $\mu$ mol/L, obr. 5.1 (b) znázorňuje závislost absorbance na koncentraci metronidazolu v koncentračním rozmezí 0,6-10  $\mu$ mol/L. Obr. 5.2 (a) znázorňuje absorpční spektra metronidazolu v koncentračním rozsahu 20-100  $\mu$ mol/L, obr. 5.2 (b) příslušnou kalibrační závislost. Na obr. 5.3 (a) jsou uvedeny absorpční spektra ornidazolu v rozmezí koncentrací 0,6-10  $\mu$ mol/L obr. 5.3 (b) znázorňuje závislost absorbance na koncentraci ornidazolu v koncentračním rozmezí 0,6-10  $\mu$ mol/L. Obr. 5.4 (a) znázorňuje absorpční spektra ornidazolu v koncentračním rozsahu 20-100  $\mu$ mol/L, obr. 5.4 (b) příslušnou kalibrační závislost.

V tabulce 5.1 jsou uvedeny parametry kalibračních závislostí pro metronidazol a ornidazol, v tabulce 5.2 je statistické vyhodnocení obou studovaných látek pro nejnižší naměřenou koncentraci  $6 \cdot 10^{-7}$  mol/L a nejvyšší naměřenou koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L.

## 5.1 Metronidazol

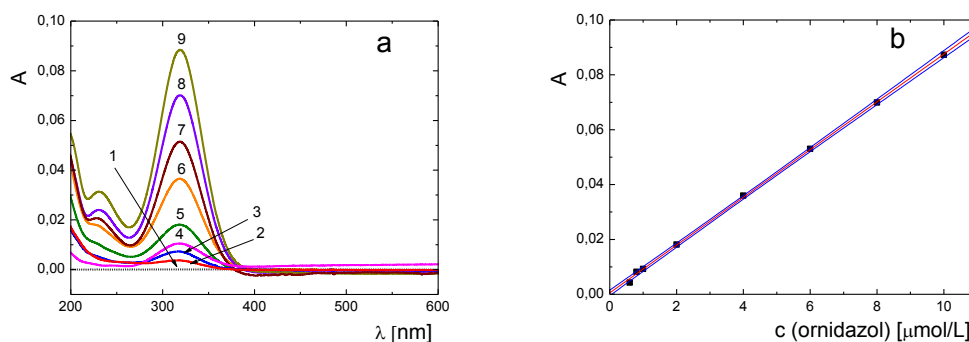


**Obr. 5.1** (a) Absorpční spektra metronidazolu v deionizované vodě, spektra jsou měřena v oblasti vlnových délek 200-800 nm v křemenné kyvetě o optické délce 1 cm proti deionizované vodě. Deionizovaná voda (1), koncentrace metronidazolu v  $\mu\text{mol/L}$  0,6 (2); 0,8 (3); 1 (4); 2 (5); 4 (6); 6 (7); 8 (8); 10 (9) (a), Závislost absorbance na koncentraci metronidazolu v rozmezí koncentrací 0,6-10  $\mu\text{mol/L}$  (b).



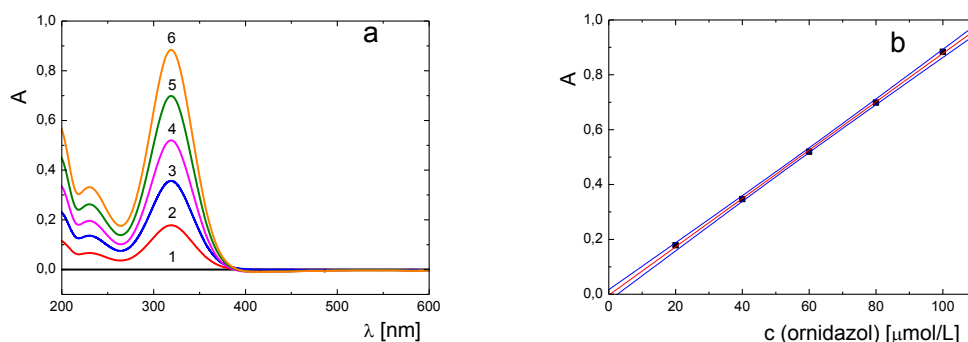
**Obr. 5.2** (a) Absorpční spektra metronidazolu v deionizované vodě, spektra jsou měřena v oblasti vlnových délek 200-800 nm v křemenné kyvetě o optické délce 1 cm proti deionizované vodě. Deionizovaná voda (1), koncentrace metronidazolu v  $\mu\text{mol/L}$  20 (2); 40 (3); 60 (4); 80 (5); 100 (6). Závislost absorbance na koncentraci metronidazolu v rozmezí koncentrací 20-100  $\mu\text{mol/L}$  (b).

## 5.2 Ornidazol



**Obr. 5.3** (a) Absorpční spektra ornidazolu v deionizované vodě, spektra jsou měřena v oblasti vlnových délek 200-800 nm v křemenné kyvetě o optické délce 1 cm proti deionizované vodě. Deionizovaná voda (1), koncentrace ornidazolu v  $\mu\text{mol/L}$  0,6 (2); 0,8 (3); 1 (4); 2 (5); 4 (6); 6 (7); 8 (8); 10 (9).

Závislost absorbance na koncentraci ornidazolu v rozmezí koncentrací 0,6-10  $\mu\text{mol/L}$  (b).



**Obr. 5.4** (a) Absorpční spektra ornidazolu v deionizované vodě, spektra jsou měřena v oblasti vlnových délek 200-800 nm v křemenné kyvetě o optické délce 1 cm proti deionizované vodě. Deionizovaná voda (1), koncentrace ornidazolu v  $\mu\text{mol/L}$  20 (2); 40 (3); 60 (4); 80 (5); 100 (6).

Závislost absorbance na koncentraci ornidazolu v rozmezí koncentrací 20-100  $\mu\text{mol/L}$  (b).

### Tabulka 5.1

Parametry kalibračních přímek pro stanovení obou studovaných látek UV–VIS absorpční spektrofotometrií ve vodných roztocích

Látka	$c$ [mol/L]	Směrnice <sup>a</sup> [mL/mol]	Úsek <sup>b</sup> [ $10^3$ ]	$R$	$L_Q$ [mol/L]
Metronidazol	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$9,15 \pm 0,02$	$-5,45 \pm 1,33$	0,9999	-
	$(0,6-10) \cdot 10^{-6}$	$8,97 \pm 0,18$	$-0,82 \pm 0,97$	0,9970	$2,0 \cdot 10^{-7}$
Ornidazol	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$8,81 \pm 0,10$	$-3,43 \pm 6,30$	0,9995	-
	$(0,6-10) \cdot 10^{-6}$	$8,70 \pm 0,08$	$-0,51 \pm 0,41$	0,9994	$3,4 \cdot 10^{-7}$

a - intervaly představující horní a dolní konfidenční limity ( $\alpha = 0,05$ )

b - úseky nejsou statisticky významně odlišné od nuly na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$

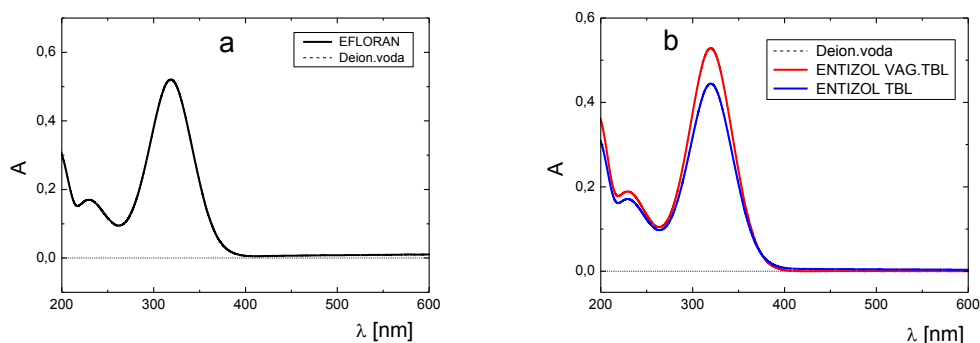
### Tabulka 5.2

Statistické vyhodnocení opakovatelnosti metronidazolu a ornidazolu UV-VIS absorpční spektrofotometrií pro nejvyšší koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L a nejnižší  $6 \cdot 10^{-7}$  mol/L v prostředí deionizované vody; počet měření  $n = 10$ , hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Látka	$c$ [mol/L]	$\tilde{x}$ [1]	$L_{1,2}$ [1]	$s$ [1]	$s_r$ [%]
MTZ	$6 \cdot 10^{-7}$	$48,3 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^{-4}$	3,7
	$1 \cdot 10^{-4}$	$882,4 \cdot 10^{-3}$	$6,6 \cdot 10^{-3}$	$9,3 \cdot 10^{-3}$	1,1
ORN	$6 \cdot 10^{-7}$	$43,8 \cdot 10^{-4}$	$2,3 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-4}$	6,8
	$1 \cdot 10^{-4}$	$8836,5 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^{-4}$	$3,1 \cdot 10^{-4}$	0,035

### 5.3 Srovnávací metoda UV-VIS absorpční spektrofotometrie pro stanovení obsahu metronidazolu v léčivech

Obsah metronidazolu se nejčastěji stanovuje spektrofotometricky. Pro porovnání voltametrického měření bylo zjištěno množství metronidazolu v léčivých preparátech i UV-VIS absorpční spektrofotometrií. Připravily se vhodně naředěné roztoky léčiv, tak aby ležely na středu sestrojené kalibrační přímky metronidazolu a proměřila se jednotlivá absorpční spektra v rozmezí vlnových délek 200-800 nm v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 1 cm. Spektra jsou uvedena na obr.5.5 (a) pro 500 x zředěný infuzní roztok-Efloran a na obr. 5.5 (b) jsou absorpční spektra Entizolu tablet (250 x zředěný roztok) a vaginálních tablet (100 x zředěný roztok). Množství metronidazolu bylo vypočteno z rovnice regrese, parametry kalibrační přímky jsou uvedeny v tabulce 5.3. Zjištěný obsah metronidazolu je uveden v tabulce 5.4.



**Obr. 5.5** (a) Absorpční spektrum 500 x zředěného infuzního roztoku-Efloranu (a), absorpční spektra 250 x zředěného roztoku tablety Entizolu a 100 x zředěného roztoku vaginální tablety Entizolu (b) měřené v deionizované vodě, v kyvetě 1 cm, v rozmezí vlnových délek 200-800 nm



### Tabulka 5.3

Parametry kalibrační závislosti metronidazolu v rozsahu koncentrací 20-100  $\mu\text{mol/L}$  metodou UV-VIS absorpční spektrofotometrií

$c$ [mol/L]	Směrnice <sup>a</sup> [mL/mol]	Úsek <sup>b</sup> [ $10^3$ ]	$R$
$(2-10) \cdot 10^{-5}$	$9,15 \pm 0,02$	$-5,45 \pm 1,33$	0,9999

a - intervaly představující horní a dolní konfidenční limity ( $\alpha = 0,05$ )

b - úseky nejsou statisticky významně odlišné od nuly na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$

### Tabulka 5.4

Vypočtený obsah metronidazolu v léčivých preparátech pomocí UV-VIS absorpční spektrofotometrie

Léčivo	$m$ vypočtené [mg]	$m$ deklarované [mg]	$w$ [%]
Efloran-infuzní roztok	$479,9 \pm 24,8$	500	96
Entizol-tableta	$219,1 \pm 41,8$	250	88
Entizol-vaginální tableta	$497,5 \pm 30,8$	500	99

## 6. Závěr a shrnutí dosažených výsledků

V této diplomové práci bylo studováno voltametrické chování nitroimidazolových léčiv metronidazolu a ornidazolu. Byly vypracovány metody stanovení obou léčiv pomocí technik DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrodě (m-AgSAE). Optimální podmínky pro jejich stanovení byly nalezeny pro koncentrační rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L ve vodném roztoku Brittonova-Robinsonova pufru (BR pufru) o pH 8,0. Získané výsledky byly porovnány s alternativními metodami stanovení (tabulka 6.1).

Vyvinuté voltametrické metody byly aplikovány na modelové vzorky pitné a říční vody s dosaženými  $L_Q \approx 2 \cdot 10^{-7}$  mol/L pro DCV i DPV.

Nově vyvinuté voltametrické metody byly použity pro stanovení obsahu metronidazolu v lékových preparátech: Efloran – infuzní roztok 500 mg/100 mL (KRKA, Slovinsko), Entizol 500 mg - vaginální tablety (Polpharma, Polsko), Entizol 250 mg – tablety (Polpharma, Polsko). Množství metronidazolu v daných lékových formách bylo zjištěno v rozmezí od 70 % do 100 %. Nejméně bylo zjištěno u Entizol 250 mg – tablety voltametricky i UV-VIS absorpční spektrofotometrií.

Voltametrické metody byly porovnány s UV-VIS absorpční spektrofotometrií a meze stanovitelnosti obou analytických metod byly za daných podmínek srovnatelné.

Byl prostudován mechanismus redukce metronidazolu a ornidazolu pomocí cyklické voltametrie. Z cyklických voltamogramů je patrné, že se jedná o výměnu čtyř elektronů podle rovnic:

Kyselé a neutrální pH:



Zásadité pH:



**Tabulka 6.1**

Stanovení metronidazolu a ornidazolu DCV a DPV na m-AgSAE a porovnání mezi stanovitelnosti na jiných elektrodách.

Léčivo	Technika	Elektroda	Prostředí	$L_Q$ [mol/L]	Literatura
Metronidazol	DCV	m-AgSAE	BR pufr pH 8,0	$3,2 \cdot 10^{-7}$	-
	DPV			$1,9 \cdot 10^{-7}$	-
	DCV	p-AgSA-CE	BR pufr pH 4,0	$2,4 \cdot 10^{-6}$	70
	DPV			$4,3 \cdot 10^{-6}$	70
	DPV	HMDE	BR pufr pH 9,0	$3,6 \cdot 10^{-8}$	7
	DPV	GCE	BR pufr pH 4,5	$3,4 \cdot 10^{-6}$	71
	DPV	DNA modifikovaná GCE	BR pufr pH 4,5	$1,7 \cdot 10^{-6}$	71
Ornidazol	DCV	m-AgSAE	BR pufr pH 8,0	$1,5 \cdot 10^{-7}$	-
	DPV			$2,3 \cdot 10^{-7}$	-
	DPP	HMDE	Fosfátový pufr pH 9,5	$1,2 \cdot 10^{-6}$	72
	DPV	GCE	BR pufr pH 7,0	$4,4 \cdot 10^{-8}$	28
	DPV	HMDE	BR pufr pH 9,0	$3,3 \cdot 10^{-8}$	7

p-AgSA-CE- leštěná stříbrná pevná amalgamová kompozitní elektroda

GCE-skleněná uhlíková elektroda

## 7. Použitá literatura

1. Raether, W.; Hänel, H.: Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitology Reserch.* **90**, S19-39 (2003)
2. Man, Ch.Ch.; Priscila, L.B.; Yean, L.S.: A prodrug approach to improve the physico-chemical properties and decrease the genotoxicity of nitro compounds. *Current Pharmaceutical Design* **17**:32, 3515-3526 (2011)
3. Chien, Y.W.; Mizuba, S.S.: Activity-electroreduction relationship of antimicrobial metronidazole analogs. *Journal of Medicinal Chemistry* **21**:4, 374-380 (1978)
4. Jiang, X.; Lin, X.: Voltammetry of the interaction of metronidazole with DNA and its analytical applications. *Bioelectrochemistry* **68** 206-212 (2006)
5. Edwards, D.J.: The action of metronidazole in DNA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **3** 43-47 (1977)
6. Edwards, D.J.: Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanism. Mechanism of action *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **31** 9-20 (1993)
7. Gui, Y.; Ni, Y.N.; Kokot, S.: Simultaneous determination of three 5-nitroimidazoles in foodstuffs by differential pulse voltammetry and chemometrics. *Chinese Chemical Letters* **22** 591-594 (2011)
8. Chemspider-the chemical database, RSC Advancing the chemical sciences  
Dostupné z URL: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4029.html?rid=1cb30654-cbc7-4104-9527-8e04c57fa6a>> [staženo 17.11.2011]
9. Český lékopis 1997. Dostupné z URL: <<http://www.lekopis.cz>> [staženo 2.1.2012]
10. Douglas L. Mayers: *Antimicrobial drug resistance: mechanism of drug resistance*. Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC  
Springer Dordrecht Heidelberg London New York (2009) DOI 10.1007/087-1-59745-180-2\_19
11. Freeman, C.D.; Klutman N.E.; Lamp, K.C.: Metronidazole- A therapeutic review and update. *Drugs* **54**:5, 679-708 (1997)
12. Francis, P.; Tally, M.D. Sullivan, C.E. Ph.D.: Metronidazole: in vitro activity, pharmacology and efficacy in anaerobic bacterial infection. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* **1**:1 28-38, (1981)

13. David E. Golan, Armen H. Tashjian, Jr Ehrin J. Armstrong, April W. Armstrong: *Principles of Pharmacology The Patophysiologic Basis of Drug Therapy*. 2, nakladatelství Walters Kluwer, Lippincott Williams&Wilkins, Baltimore (2008)
14. Richard Finkel, Michelle Alexia Clark, Pamela C. Champe, Luigi X. Cubeddu: *Pharmacology Lippincott's Illustrated Reviews*. 4, nakladatelství Lippincott Williams&Wilkins, Baltimore (2009).
15. Thomsen, U.G.; Cornett, C.; Tjørnelund, J.; Hansen S.H.: Separation of metronidazole, its major metabolites and their conjugates using dynamically modified in silica. *Journal of Chromatography A* **697** 175-184 (1995)
16. Healthplus 24 Gateway to your health Dostupné z URL: <[www.healthplus24.com/Drug-information112/ornidazole.aspx](http://www.healthplus24.com/Drug-information112/ornidazole.aspx)> [staženo 5.4.2012]
17. Antibioticlist-drug related information Online Dostupné z URL: <[www.antibioticlist.com/ornidazole.html](http://www.antibioticlist.com/ornidazole.html)> [staženo 5.4.2012]
18. Bone W. Yeung CH. Skupin R, Haufe G., Cooper TG: Toxicity of ornidazole and its analogues to rat spermatozoa as reflected in motility parameters. *Journal of Andrology* **20**:6, 347-355 (1998)
19. Mc Clain, R.M.; Downing, J.C.: Reproduction studies in rats treated with ornidazole. *Toxicology and Applied Pharmacology* **92**:3, 480-487 (1988)
20. O'Gladly, F.; Lambert, H.P.: *Antibiotic and Chemotherapy: anti-infective agents and their use in therapy* 1997, Churchill Livingstone) (Dustri-Verlag Feistle: *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology*, svazek 22)
21. Schwartz, D.E.; Jeunet F.: Comparative pharmacokinetic studies of ornidazole and metronidazole in man. *Chemotherapy* **22** 19-29 (1976)
22. Schwartz, D.E.; Jordan, J.C.; Vetter, W.; Oesterhelt, G.: Metabolic studies of ornidazole in the rat, in the dog and in man. *Xenobiotica* **9**:9, 571-581
23. Gupka, K.V.; Jain, R.; Radhapyari, K.; Jadon, N.; Agarwal S.: Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals. *Analytical Biochemistry* **408** 179-196 (2011)
24. Lú, S.; Wu, K.; Dang, X.; Hu, S.: Electrochemical reduction and voltammetric determination of metronidazole at a nanomaterial thin film coated glassy carbon electrode. *Talanta* **63** 653-657 (2004)

25. Rezai, B.; Damiri, S.:Fabrication of nanostructure thin film on the gold electrode using continuous pulsed-potential technique and its application for the electrocatalytic determination of metronidazole. *Electrochimica Acta* **55** 1801-1808 (2011)
26. Gholivand, M.B.; Torkashvand, M.:A novel high selective and sensitive metronidazole voltammetric sensor based on a molecularly imprinted polymer-carbon paste electrode. *Talanta* **84** 905-912 (2011)
27. Tiwari, D.C.; Jain, R.; Sahu, G.:Electrochemical reduction of ornidazole at composite polymer membrane electrode.*Indian Journal of Chemical Technology* **14** 560-565 (2007)
28. Elquadaby, H.M. et.al., Validated voltammetric method for the determination of some antiprotozoa drugs based on the reduction at an activated glassy carbon electrode.*Arabian Journal of Chemistry* (2011), doi:10.1016/j.arabjc.2011.05.019
29. Özkan, S.A.; Özkan, Y.; Sentürk, Z.:Electrochemical reduction of metronidazole at activated glassy carbon electrode and its determination in pharmaceutical dosage forms.*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **17** 299-305 (1998)
30. Turan, S.; Durmus, Z. and Kilic, E.:Electrochemical behaviour of ornidazole and its adsorptive stripping determination in pharmaceuticals.*Current Pharmaceutical Analysis* **5** 416-423 (2009)
31. Wang, Z.; Zhou, H. and Zhou S.:Study on the determination of metronidazole in the human serum by adsorptive stripping voltammetry.*Talanta* **40**:7, 1073-1075 (1993)
32. Salvatore Fanali :Identification of chiral drugs isomers by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **735** 77-121 (1996)
33. Koppenhoefer, B.; Zhu, X.; Jakob, A.; Wuerthner S.; Lin, B.:Separation of drug enantiomers by capillary electrophoresis in the presence of neutral cyclodextrins. *Journal of Chromatography A* **875** 135-161 (2000)
34. McGrath, G.; Mc. Clean, S.; O’Kane, E.; Smyth, W.F.; Tagliaro, F.:Study of the capillary zone electrophoretic behaviour of selected drugs, and its comparison with other analytical techniques for their formulation assay. *Journal of Chromatography A* **735** 237-247 (1996)
35. Manaenkov, O.V.; Sidorov, A.I.; Sulman, É.M.:Quantitative determination of metronidazole by capillary band electrophoresis with UV detection. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **37**:11 (2003)
36. Fin, W.; Li, W.; Xu, Q.; Dong, Q.:Quantitative assay of metronidazole by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a gold microelectrode. *Electrophoresis* **21**:7, 1409-1414 (2000)

37. Khoo Lay See; Abdalla A. Elbashir; Bahruddin Saad; Abdussalam Salnin Mohamed Ali and Hassan Y. Aboul: Simultaneous determination of ofloxacin and ornidazole in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis. *Biomedical Chromatography* **23** 1283-1290 (2009)
38. Ashour, S.; Kattan, N.: Simultaneous determination of miconazole nitrate and metronidazole in different pharmaceutical dosage forms by gas chromatography and flame ionization detector (GC-FID). *International Journal of Biomedical Science* **6**:1, 13-18 (2010)
39. Mustapha, K.B.; Odunola, M.T.; Garba, M. and Obodozie, O.: Rapid, cost-effective liquid chromatographic method for the determination of metronidazole in biological fluids. *African Journal of Biotechnology* **5**:13, 1188-1190 (2006)
40. Xi, X.; Xiaowei, L.; Jianzhong, S.; Suxia, Z.; Shuangyang, D.; Haiyang, J.: Determination of nitroimidazole residues in porcine urine by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists International* **89**:4, 1116-1119 (2006)
41. Tsai, T.H.; Chen, Y.F.: Pharmacokinetics of metronidazole in the rat blood, brain and bile studies by microdialysis coupled to microbore liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **987** 277-282 (2003)
42. Xia, X.; Li, X.; Zhang, S.; Ding, S.; Jiang, H.; Li, J.; Shen, J.: Simultaneous determination of 5-nitroimidazoles and nitrofurans in pork by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1208** 101-108 (2008)
43. Xi, X.; Li, X.; Jianzhong, S.; Zhang, S.; Ding, S.; Jiang, H.: Determination of nitroimidazole residues in porcine urine by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. *Journal of Association of Official Agricultural Chemists International* **89**:4 1116-1119 (2006)
44. N. Tavakoli, N.; Varshosaz, J.; Dorkoosh, F.: Development and validation of a simple HPLC method for simultaneous in vitro determination of amoxicillin and metronidazole at single wavelength. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical* **43**:1 325-329 (2007)
45. Elkady, E.F.; Mahrouse, M.A.: Reversed-phase ion-pair HPLC and TLC-Densitometric methods for the simultaneous determination of ciprofloxacin hydrochloride and metronidazole in tablets. *Chromatographia* **73**:3-4, 297 – 305 (2011)
46. Gattebecchia, E.; Tonelli, D.: Determination of metronidazole, misonidazole and its metabolite in serum and urine on RP-18-high performance thin-layer-chromatographic plates. *Journal of Chromatography B* **224**:3, 465-471 (1981)

47. Mahrouse, M.A.; Elkady, E.F.:Validated spectrophotometric methods for the simultaneous determination of ciprofloxacin hydrochloride and metronidazole in tablets. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **59**:12 1485-1493 (2011)
48. Darwish, K.M.; Salama, I.; Mostafa, S.; El-Sadek, M.:Extractional spectrophotometric analysis of metronidazole, tinidazole, ornidazole and secnidazole bases throat acid-dyl complexation using bromthymol blue dye. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* **25**:1, 207-217 (2012)
49. Nagaraja, P.; Sunitha, K.R.; Vashanta, R.A.; Yathirajan, H.S.:Spectrophotometric determination of metronidazole and tinidazole in pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **28**:3-4, 527-535 (2002)
50. Nagaraja, P.; Rangappa, K.S.:A sensitive spectrophotometric assay for tinidazole and metronidazole using a Pd -C and formic acid reduction system. *Turkish Journal of Chemistry* **28** 335-343 (2004)
51. Kamel, M.S.; Barsoum, B.N.; Sayed, R.:Determination of some important antibacterial drugs using alizarins and thymol blue UV – Visible spectrophotometry. *Journal of Applied Sciences* **5**:7, 880-886 (2009)
52. Adegoke, A.O.; Umoh, O.E.:A new approach to the spectrophotometric determination of metronidazole and tinidazole using p-dimethylaminobenzaldehyde. *Acta Pharmaceutica* **59** 407-419 (2009)
53. Salem, A.A.; Mossa, H.A.; Barsoum, B.N.:Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy for quantitative analysis of miconazole, metronidazole and sulfamethoxazole in pharmaceutical and urine samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**:2 654-661 (2006)
54. Jafari, M.T.; Rezali, B.; Zaker, B.:Ion mobility spectrometry as a detector for molecular imprinted polymer separation and metronidazole determination in pharmaceutical and human serum samples. *Analytical Chemistry* **81**:9, 3585-3591, (2009)
55. Barek, J.; Pecková, K.; Vyskočil, V.:Kam směřují moderní elektroanalytické metody 50 let po udělení Nobelovy ceny za polarografii. *Chemické Listy* **103** 889-893 (2009)
56. Novotný, L.; Yosypchuk, B.:Pevné stříbrné amalgamové elektrody. *Chemické Listy* **94** 1118-1120 (2000)
57. Yosypchuk, B.; Barek, J.:Vlastnosti pevných a pastových amalgamových pracovních elektrod odlišných od elektrod z kovové rtuti. *Chemické Listy* **103** 284-290 (2009)
58. Heyrovský, J.; Kůta, J.: *Základy polarografie*. Nakladatelství ČSAV, Praha 1962



59. Boyd, A.S.; Seger, D.; Vannuci, S.; Langley, M.; Abraham, J.L.; King, L.E.: Mercury exposure and cutaneous disente, *Journal of American Academy of Dermatology*. **43** 81 (2000)
60. Cabalková, D.; Barek, J.; Pecková, K.; Fischer, J.; Navrátil, T.; Yosypchuk, B.: Voltametrické stanovení herbicidu bifenoxu na stříbrné pevné amalgamové elektrodě modifikované rtuťovým meniskem. *Chemické Listy* **103** 236-242 (2009)
61. Tuček, M.; Bencko, V.; Krýsl, S.: Zdravotní rizika rtuti zubních amalgámů. *Chemické Listy* **101** 1038 (2007)
62. Vyskočil, V.; Daňhel, A.; Fischer, J.; Novotný, V.; Deylová, D. aj.: Krása a užitečnost nových elektrodových materiálů. *Chemické Listy* **104** 1181-1195 (2010)
63. Yosypchuk, B.; Novotný, L.: Electrodes of Nontoxic solid Amalgams for Electrochemical Measurements. *Electroanalysis* **14** 1733-1738 (2002)
64. Jiránek, I.; Červený, V.; Barek, J.; Rychlovský, P.: Comparison of Mercury vapor Pressure of silver amalgam-based Electrode Materials used AAS. *Analytical Letters* **43** 1387 (2010)
65. Yosypchuk, B.; Novotný, L.: Nontoxic electrodes of solid amalgam. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. **32** 141 (2002)
66. Yosypchuk, B.; Barek, J.: Analytical Applications of solid and paste amalgam electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. **39** 189-203 (2009)
67. Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. Nakladatelství Karolinum Univerzita Karlova v Praze 2010
68. Zurman, P.; Fijalek, Z.; Durmanovic, D.; Sužnjevič, D.: Polarographic and electrochemical studies of some aromatic and heterocyclic nitro compounds part.I: General mechanistic aspect. *Electroanalysis* **4**:8, 783-794 (1994)
69. La-Scalea, M.A.; Serrano, S.H.P.; Gutz, I.G.R.: Voltammetric Behaviour of Metronidazole at Mercury Electrodes. *Journal of Brazilian Chemical Society* **10**:2, 127-135 (1999)
70. Vyskočil, V.; Navrátil, T.; Daňhel, A.; Dědík, J.; Krejčová, Z.; Škvorová, L.; Tvrdíková, J.; Barek, J.: Voltammetric determination of selected nitro compounds at a polished silver solid amalgam composite electrode. *Electroanalysis* **23**:1, 129-139 (2011)
71. Brett, A.M.O.; Serrano S.H.P.; Gutz, I.; La-Scalea, M.A.: Electrochemical reduction of metronidazole at a DNA-modified glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **42**:2, 175-178 (1997)

72. Jain, R.; Mishra, R.; Dwivedi, A.:Effect of surfactant on voltammetric behaviour of ornidazole. *Colloids and Surfaces A:Physicochemical and Engineering Aspect* **337**:1-3, 74-79 (2009)