

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



**Bc. Monika Šmídková**

**VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ  
5-NITROIMIDAZOLU – STRUKTURNÍ JEDNOTKY  
NITROIMIDAZOLOVÝCH LÉČIV**

**Voltammetric Determination of 5-Nitroimidazole –  
The Structural Unit of Nitroimidazole Drugs**

Diplomová práce

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

Praha 2013

Tato diplomová práce vznikla v rámci Univerzitního výzkumného centra UNCE 204018/304018/2012 v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM 0021620857. Poděkování za její finanční podporu patří Grantové agentuře České republiky (projekt P206/12/G151).

### **Prohlášení**

Tato diplomová práce byla vypracována na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2011 – 2013.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Vlastimila Vyskočila, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Praze dne 10. 5. 2013

.....  
podpis

V úvodu bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné připomínky k mé práci, dále pak Mgr. Evě Horákové a Mgr. Andree Hájkové a ostatním členům Katedry analytické chemie za pomoc a ochotu.

Mé poděkování patří též rodičům, kteří mi umožnili studium na vysoké škole, a mým přátelům za všestrannou podporu.

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá studiem elektrochemického chování 5-nitroimidazolu (5-NI) a nalezením optimálních podmínek pro jeho stanovení technikami DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě (m-AgSAE) a borem dopované diamantové filmové elektrodě (BDDFE) a porovnává dosažené meze stanovitelnosti ( $L_Q$ ).

Jako optimální prostředí pro naměření kalibračních závislostí 5-NI na m-AgSAE v deionizované vodě bylo vybráno prostředí Brittonova-Robinsonova pufru (BR pufru) o pH 7,0 pro techniku DCV, pro techniku DPV bylo zvoleno optimální prostředí BR pufru o pH 10,0. U obou technik je vhodné použít elektrochemickou regeneraci povrchu elektrody pomocí vkládání dvojice regeneračních potenciálů  $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -800 \text{ mV}$ . Proměřeno bylo koncentrační rozmezí  $1 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a dosažená  $L_Q$  na m-AgSAE byla  $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  pro techniku DCV a  $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  pro techniku DPV.

Koncentrační závislosti 5-NI na BDDFE byly proměřeny technikou DCV v prostředí BR pufru o pH 3,0. Pro stanovení 5-NI technikou DPV na BDDFE byl jako optimální prostředí zvolen BR pufr o pH 2,0, ale z důvodu výskytu interferujícího píku v základním elektrolytu byly koncentrační závislosti naměřeny v prostředí  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  acetátového pufru o pH 4,6. Pro obě metody byly nalezeny vhodné regenerační potenciály vkládané na pracovní elektrodu  $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = 1700 \text{ mV}$ . Při proměření koncentračního rozmezí  $1 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  nabývaly dosažené  $L_Q$  hodnot  $6,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  pro techniku DCV a  $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  pro techniku DPV.

Aplikovatelnost nově vyvinutých metod stanovení 5-NI byla ověřena na modelových vzorcích pitné a říční vody. Dosažené  $L_Q$  jsou byly řádově  $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  pro obě metody (DCV i DPV) na m-AgSAE. Pro metody DCV a DPV na BDDFE byly meze stanovitelnosti za daných podmínek srovnatelné.

Cyklickou voltametrií (CV) byl také zkoumán mechanismus elektrochemické redukce 5-NI na obou zmiňovaných pracovních elektrodách. Bylo zjištěno, že redukční děj je řízen čistě difuzí pouze na BDDFE, a to jen v silně alkalickém prostředí. V ostatních případech je rychlost elektrochemického děje zčásti ovlivněna reakční kinetikou přenosu náboje.

## ABSTRACT

Presented Diploma Thesis deals with the study of electrochemical behavior of 5-nitroimidazole (5-NI), with the search for optimal conditions for its determination using techniques of DC voltammetry (DCV) and differential pulse voltammetry (DPV) at a mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode (m-AgSAE) and at a boron-doped diamond film electrode (BDDFE), and with the comparison of reached limits of quantification ( $L_{QS}$ ).

The optimal conditions found for measuring calibration dependences of 5-NI at the m-AgSAE in deionized water were as follows: Britton-Robinson buffer of pH 7.0 and 10.0 for DCV and DPV, respectively. At both techniques, it is advisable to use an electrochemical regeneration of the electrode surface by the application of a couple of regeneration potentials  $E_{reg,1} = 0$  mV and  $E_{reg,2} = -800$  mV. The calibration dependences were measured in the concentration range from  $1 \cdot 10^{-6}$  to  $1 \cdot 10^{-4}$  mol $\cdot$ l $^{-1}$ , with the  $L_{QS}$  of  $1.0 \cdot 10^{-6}$  mol $\cdot$ l $^{-1}$  for DCV at the m-AgSAE and  $1.5 \cdot 10^{-6}$  mol $\cdot$ l $^{-1}$  for DPV at the m-AgSAE.

The concentration dependences of 5-NI at the BDDFE were measured using the DCV technique in the BR buffer of pH 3.0. For the DPV technique, the optimal medium seemed to be the BR buffer of pH 2.0, however, because of the presence of an interfering peak in the supporting electrolyte, the concentration dependences were measured alternatively in the 0.1 mol l $^{-1}$  acetate buffer of pH 4.6. For both techniques, optimal regeneration potentials were found as  $E_{reg,1} = 0$  mV and  $E_{reg,2} = 1700$  mV. At the measurement of the concentration ranges of 5-NI from  $1 \cdot 10^{-6}$  to  $1 \cdot 10^{-4}$  mol $\cdot$ l $^{-1}$ , the  $L_{QS}$  reached were  $6.0 \cdot 10^{-7}$  and  $1 \cdot 10^{-6}$  mol $\cdot$ l $^{-1}$  for DCV and DPV, respectively.

The applicability of the newly developed methods for the determination of 5-NI was verified on model samples of drinking and river water. The attained  $L_{QS}$  of 5-NI at the m-AgSAE were in the concentration order of  $10^{-6}$  mol $\cdot$ l $^{-1}$  for both DCV and DPV. For DCV and DPV at the BDDFE, the  $L_{QS}$  reached at given conditions were comparable.

Moreover, the mechanism of electrochemical reduction of 5-NI was investigated at both aforementioned working electrodes using cyclic voltammetry. It was found that the reduction of 5-NI is fully controlled by the diffusion only at the BDDFE, just in strongly alkaline media. In all other cases, the rate of the electrochemical process is partially influenced by the charge-transfer reaction kinetics.

**Klíčová slova:** 5-Nitroimidazol  
DC voltametrie  
Diferenční pulzní volumetrie  
Cyklická voltametrie  
Stříbrná pevná amalgámová elektroda  
Borem dopovaná diamantová filmová elektroda

---

**Key Words:** 5-Nitroimidazole  
DC Voltammetry  
Differential Pulse Voltammetry  
Cyclic Voltammetry  
Silver Solid Amalgam Electrode  
Boron-Doped Diamond Film Electrode

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

$\lambda$	vlnová délka [nm]
$\lambda_{\max}$	vlnová délka absorpčního maxima [nm]
5-NI	5-nitroimidazol
$A$	absorbance
BDDFE	Borem dopovaná diamantová filmová elektroda
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
$c$	molární koncentrace [ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
CE	kapilární elektroforéza
CV	cyklická voltametrie
DCV	DC voltametrie (voltametrie s lineárním nárůstem potenciálu)
DPV	diferenční pulzní voltametrie
$E$	potenciál [mV]
$E_p$	potenciál píku [mV]
$E_{\text{reg},1}$	počáteční potenciál regenerace [mV]
$E_{\text{reg},2}$	konečný potenciál regenerace [mV]
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
$I$	proud [nA]
$I_p$	proud (výška) píku [nA]
$L_Q$	mez stanovitelnosti
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda
$n$	počet měření
$s$	směrodatná odchylka
$s_r$	relativní směrodatná odchylka [%]
$t$	čas [min]
UV-VIS	ultrafialová-viditelná oblast elektromagnetického záření
$v$	rychlost polarizace [ $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
ZE	základní elektrolyt

## Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
1.1 Cíle práce .....	10
1.2 Studovaná látka 5-Nitroimidazol .....	11
1.3 Nitroimidazolová léčiva .....	12
1.4 Analytické metody stanovení 5-nitroimidazolových derivátů .....	14
<b>2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>16</b>
2.1 Reagencie .....	16
2.2 Aparatura .....	16
2.3 Použité pracovní elektroda .....	17
2.3.1 m-AgSAE .....	17
2.3.2 BDDFE .....	18
2.4 Pracovní postupy .....	20
2.5 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení získaných dat .....	21
2.6 Stálost zásobního roztoku 5-nitroimidazolu .....	22
<b>3. VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 5-NITROIMIDAZOLU NA STŘÍBRNÉ PEVNÉ AMALGÁMOVÉ ELEKTRODĚ</b> .....	<b>24</b>
3.1 DC voltametrie 5-nitroimidazolu .....	24
3.1.1 pH závislost .....	24
3.1.2 Vliv regeneračních potenciálů .....	26
3.1.3 Koncentrační závislosti .....	27
3.1.4 Stanovení 5-NI v modelových vzorcích pitné a říční vody .....	29
3.2 Diferenční pulzní voltametrie 5-nitroimidazolu .....	31
3.2.1 pH závislost .....	31
3.2.2 Vliv regeneračních potenciálů .....	33
3.2.3 Koncentrační závislosti .....	34
3.2.4 Stanovení 5-NI v modelových vzorcích pitné a říční vody .....	36
3.2.5 Adsorpční rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie 5-NI .....	38
<b>4. VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 5-NITROIMIDAZOLU NA BOREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODĚ</b> .....	<b>39</b>
4.1 DC voltametrie 5-nitroimidazolu .....	39



4.1.1	pH závislost .....	39
4.1.2	Vliv regeneračních potenciálů .....	42
4.1.3	Koncentrační závislosti .....	43
4.1.4	Stanovení 5-NI v modelových vzorcích pitné a říční vody .....	45
4.2	Diferenční pulzní voltametrie 5-nitroimidazolu .....	47
4.2.1	pH závislost .....	47
4.2.2	Vliv regeneračních potenciálů .....	49
4.2.3	Koncentrační závislosti .....	50
4.2.4	Stanovení 5-NI v modelových vzorcích pitné a říční vody .....	53
<b>5.</b>	<b>CYKlickÁ VOLTAMETRIE .....</b>	<b>55</b>
5.1	Cyklická voltametrie 5-nitroimidazolu na m-AgSAE .....	55
5.2	Cyklická voltametrie 5-nitroimidazolu na BDDFE.....	57
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>60</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>62</b>

# 1. ÚVOD

## 1.1 Cíle práce

Cílem předložené diplomové práce bylo studium elektrochemického chování 5-nitroimidazolu (5-NI) – strukturní jednotky nitroimidazolových léčiv – pomocí technik DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrodě (m-AgSAE), ověření aplikovatelnosti vyvinutých metod pro stanovení 5-nitroimidazolu v modelových vzorcích pitné a říční vody a ověření možnosti využití adsorpční rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie (AdSDPV) pro zvýšení citlivosti stanovení.

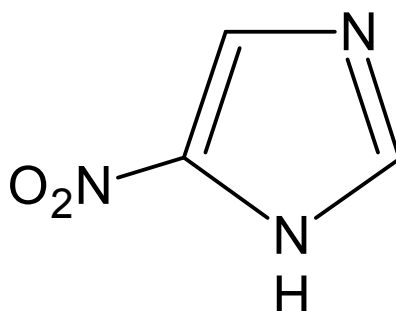
Dalším cílem bylo nalézt optimální podmínky stanovení 5-NI na borem dopované diamantové filmové elektrodě (BDDFE), aplikovat nově vyvinuté metody na stanovení 5-NI v modelových vzorcích pitné a říční vody a tyto výsledky porovnat s daty naměřenými na m-AgSAE.

Dále pak bylo cílem prostudování redukčního mechanismu 5-NI pomocí cyklické voltametrie (CV) na m-AgSAE a na BDDFE.

## 1.2 Studovaná látka 5-nitroimidazol

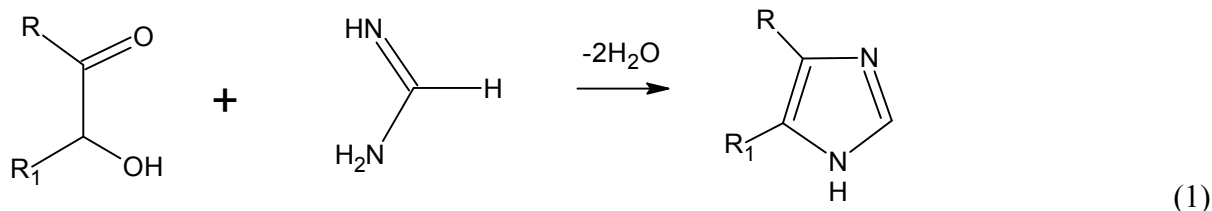
Čistá látka má za laboratorních podmínek bílou až světle žlutou barvu a jemnou krystalickou strukturu. Látka je dobře rozpustná ve vodě, její rozpustnost nabývá hodnoty  $0,40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  při  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  [1]. 5-Nitroimidazol je při požití zdraví škodlivý. Strukturální vzorec studované látky je na obr. 1.1.

CAS Name:	1- <i>H</i> -imidazole, 5-nitro-
CAS Registry Number:	3034-38-6
Sumární vzorec:	$\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_2$
Bod tání:	$303 \text{ }^\circ\text{C}$
Teplota vznícení:	$505 \text{ }^\circ\text{C}$ [2]
Molekulová hmotnost:	$113,07 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



**Obr 1.1** Strukturální vzorec 5-nitroimidazolu (5-NI)

Syntéza 5-NI může probíhat například reakcí  $\alpha$ -hydroxyketonu s formamidinem podle rovnice (1), ve které  $\text{R} = \text{H}$  a  $\text{R}_1 = \text{NO}_2$  [3]:

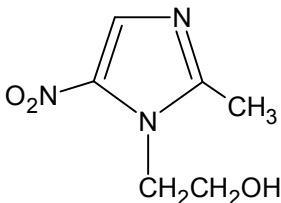
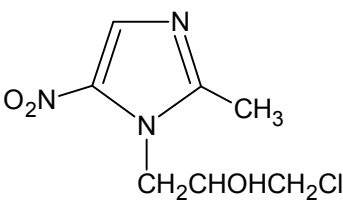
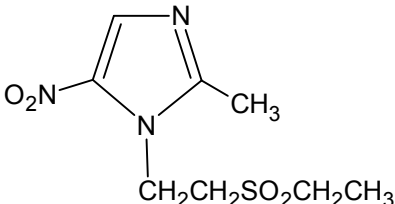
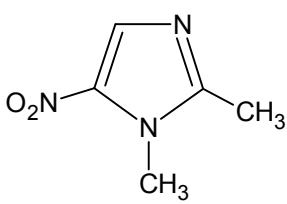


### 1.3 Nitroimidazolová léčiva

Antibiotikum azomycin (2-nitroimidazol), izolované v Japonsku ze streptomycet, bylo prvním aktivním nitroimidazolovým léčivem [4]. Tato skutečnost vedla k syntéze 5-nitroimidazolových léčiv a následnému testování jejich biologické aktivity. Mezi nejpoužívanější 5-nitroimidazolové deriváty patří metronidazol, ornidazol, tinidazol a dimetridazol. Jejich strukturní vzorce jsou uvedeny v tab. 1.1.

**Tab. 1.1**

Často využívaná 5-nitroimidazolová léčiva

Název	metronidazol	ornidazol
CAS Registry number	443-48-1	16773-42-5
Sumární vzorec	$C_6H_9N_3O_3$	$C_7H_{10}N_3O_3Cl$
Molekulová hmotnost [g·mol <sup>-1</sup> ]	171,15	219,63
Strukturní vzorec		
Název	tinidazol	dimetridazol
CAS Registry number	19387-91-8	991-92-8
Sumární vzorec	$C_8H_{13}N_3O_4S$	$C_5H_7N_3O_2$
Molekulová hmotnost [g·mol <sup>-1</sup> ]	247,27	141,13
Strukturní vzorec		

Nitroimidazolové deriváty se řadí mezi heterocyklické sloučeniny. Jsou charakterizovány imidazolovým kruhem, na který je v pozici číslo 5 navázána nitro skupina. Jejich biologická aktivita je zkoumána od roku 1953 [5].

5-Nitroimidazolové deriváty patří mezi antibiotika, vykazují antibakteriální a antiprotozoální vlastnosti. Mohou být úspěšně použity proti gramnegativním a některým grampozitivním bakteriím (*Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium*, *Clostridium*). Jsou taktéž efektivní proti anaerobním prvokům jako *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia* [6].

Tyto sloučeniny byly dříve využívány i jako veterinární léčiva, avšak dnes je toto jejich využití zakázané. Některé výzkumy tvrdí, že tato skupina látek může vykazovat karcinogenní, genotoxické či mutagenní účinky [7, 8]. Tyto jejich vlastnosti přímo souvisí s redukčním potenciálem přítomné nitroskupiny [9]. Ve směrnici EU 37/2010 je uvedeno, že tyto látky, ani jejich rezidua, nesmí být stanoveny ve zvířecích produktech určených k lidské spotřebě na území EU [10].

Kvůli nezákonnému využívání nitroimidazolových léčiv ve veterinárním průmyslu je v dnešní době kladen velký důraz na vyvinutí nových metod pro jejich stanovení ve zvířecích tkáních jako matricích. Z důvodu výskytu jejich reziduí v potravinových výrobcích může docházet k rezistenci bakterií, a tím se může snižovat efektivnost některých nitroimidazolových derivátů používaných ve zdravotnictví.

Antimikrobiální zásah nitroimidazolových léčiv probíhá uvnitř patogenního mikroorganismu. Redukovaná forma nitroskupiny reaguje s mikrobiální DNA, dochází k narušení mikrobiální struktury, a tím je zabráněno další syntéze nukleových kyselin [11, 12]. V nedávných studiích se též zkoumala protinádorová aktivita nitroimidazolových komplexů s měďnatými ionty [13]. Pomocí cyklické voltametrie bylo zjištěno, že mechanismus redukce daného nitroimidazolového derivátu je velmi ovlivněn substituentem na pozici N-1 [14].

V dnešní době jsou úspěšně syntetizována nová 5-nitroimidazolová léčiva, která vykazují vyšší efektivitu a nižší rezistenci vůči bakteriím. Často vznikají nukleofilní substitucí 1-methyl-2-chloromethyl-5-nitroimidazolu s různými nitrovanými alifatickými, cyklickými či heterocyklickými anionty [15-17].

Existují studie, které se zabývají biologickou aktivitou nitrosoimidazolů. Bylo dokázáno, že některé nitrosoimidazoly, strukturou podobné 5-nitroimidazolům, vykazují vyšší baktericidní účinky než samotné 5-nitroimidazoly [18].

## 1.4 Analytické metody stanovení nitroimidazolových derivátů

### Elektrochemické metody

Díky cenové dostupnosti, jednoduché instrumentaci a vysoké přesnosti se elektroanalytické metody hojně používají pro farmaceutické účely. Vzhledem ke snadné redukci přítomné nitroskupiny jsou voltametrické a polarografické metody výbornou možností pro stanovení nitroimidazolových léčiv ve vodných i biologických vzorcích.

V předkládané diplomové práci figuruje 5-NI jako strukturální jednotka nitroimidazolových léčiv, u kterých se předpokládá elektrochemické chování podobné jako u vlastního 5-NI, jelikož hlavní roli při elektrochemické redukci 5-NI i nitroimidazolových léčiv hraje přítomná nitroskupina. Elektrochemické chování 5-NI bylo dříve studováno cyklickou voltametrií na visící rtuťové kapkové elektrodě HMDE [19].

Elektrokatalytická redukce 2-nitro- a 5-nitroimidazolu byla studována na zlaté UPD (underpotential deposition) modifikované elektrodě v kyselých prostředích. Termínem UPD je označováno vylučování kovů při pozitivnějších potenciálech než jsou jejich rovnovážné potenciály v daném prostředí. Vznikají tak monoatomární vrstvy elektronegativních kovů (Pb, Tl, Bi) na elektro pozitivnějších materiálech (Ag, Au, Pt) [20]. Bylo zjištěno, že redukční mechanismus těchto látek záleží na velikosti vrstvy vyloučené na Au [21].

Redukce metronidazolu byla zkoumána na uhlíkové deskové mikroelektrodě, nejnižších limitů detekce bylo dosaženo pomocí techniky adsorpční rozpouštěcí voltametrie, a to  $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$  [22]. Simultánní stanovení metronidazolu, ornidazolu a tinidazolu bylo studováno pomocí techniky DPV na HMDE s dosaženými mezemi stanovitelnosti  $6,1 \mu\text{g} \cdot \Gamma^{-1}$  pro metronidazol,  $6,7 \mu\text{g} \cdot \Gamma^{-1}$  pro tinidazol a  $7,3 \mu\text{g} \cdot \Gamma^{-1}$  pro ornidazol [23]. Voltametrickým stanovením metronidazolu a ornidazolu na m-AgSAE se také zabývala diplomová práce [24] s dosaženými  $L_Q$  v řádu  $2,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$  pro obě léčiva technikou DPV.

Stanovení nitroimidazolových derivátů v lékových formách bylo prováděno na aktivované uhlíkové elektrodě [25, 26]. Tyto látky byly též stanoveny v biologických vzorcích jako je moč, krev a krevní plazma technikou diferenční pulzní polarografie [27].

### Separační metody

Separační metody se spektrometrickou detekcí patří mezi vysoce citlivé, přesné a rychlé analytické metody. Oproti elektrochemickým metodám mají ovšem nevýhodu v podobě vysokých pořizovacích a provozních nákladů.

Pravděpodobně nejčastěji používanou separační technikou pro stanovení

5-nitroimidazolových léčiv je HPLC se spektrometrickou UV detekcí [28-30]. V biologických vzorcích jsou tyto látky často stanoveny metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní tandemovou detekcí (LC-MS/MS) – tato metoda je citlivá a jako typ ionizace využívá nejčastěji ionizaci elektrosprejem [31].

Další studie pojednávají o stanovení nitroimidazolů a jejich metabolitů v potravinových produktech, například v medu [32, 33]. Mez stanovitelnosti dosáhla hodnoty až  $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Dále byly tyto látky stanoveny pomocí LC-MS/MS v kuřecím, vepřovém i krutím mase, vejcích a plazmě [34-36]. Metronidazol a tinidazol jsou v metodách LC často vzájemně využívány jako vnitřní standardy [37, 38].

Pro stanovení 5-nitroimidazolů v biologických matricích byla využita vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (HPTLC). Stanovení tinidazolu v krevním séru pomocí této metody dává srovnatelné výsledky jako jeho stanovení pomocí HPLC [39]. Nitroimidazoly lze stanovit i pomocí plynové chromatografie (GC), i když tato metoda není ve srovnání s HPLC a HPTLC tak často využívána. Vybrané deriváty byly stanoveny v krvi pomocí GC s detektorem elektronového záchytu [40].

Pro analýzu nitroimidazolových léčiv se dobře uplatňuje i kapilární elektroforéza (CE). Detektor je většinou opět UV spektrofotometrický a meze stanovitelnosti bývají o řád nižší než u HPLC [41].

Většina nitroimidazolových léčiv má na imidazolovém kruhu v pozici N-1 navázán 2-hydroxypropyl. Díky přítomnosti tohoto asymetrického substituentu je látka chirální a vyskytuje se ve dvou enantiomerních formách. Kapilární zónová elektroforéza (CZE) se využívá pro oddělení těchto jednotlivých enantiomerů za přítomnosti cyklodextrinů [42].

## **Spektrometrické metody**

U většiny spektrometrických stanovení nejprve dochází k redukci přítomné nitroskupiny a následné komplexaci s barvivem, často je používána bromthymolová modř. Takto připravená barevná sloučenina je proměřena ve viditelné oblasti absorpčního spektra [43, 44].

Za použití nukleární magnetické rezonance (NMR) byla vyvinuta metoda pro stanovení některých nitroimidazolů v lékových formách a vzorcích moči [45].

Bez předběžné separace byly stanoveny látky ofloxacin a tinidazol UV-VIS spektrofotometrií. Pro tinidazol tato metoda vykazovala linearitu v rozsahu  $10$  až  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  [46].

## 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Reagencie

Zásobní roztok 5-NI o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  byl připraven rozpuštěním 28,3 mg čisté látky (97%, Aldrich, USA) ve 250 ml deionizované vody. Roztoky o nižší molární koncentraci byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku deionizovanou vodou (produkovaná systémem Milli-Q plus, Millipore, USA). Zásobní roztok 5-NI byl skladován ve skleněné odměrné baňce zabalené v alobalovém obalu ve tmě za laboratorní teploty.

Dále byly použity tyto chemikálie: hydroxid sodný (NaOH, čistota p.a., Penta, Praha), kyselina trihydrogenboritá ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ , čistota p.a., Lachema, Brno), hexakyanoželezitan draselný ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , čistota p.a., Lachema, Brno) octová kyselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 80%), kyselina trihydrogenfosforečná ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 85%), chlorid draselný (KCl), kyselina dusičná ( $\text{HNO}_3$ , 65%), trihydrát octanu sodného ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) (vše čistota p.a., Lach-Ner, Neratovice).

Zásaditá složka Brittonova-Robinsonova pufru (BR pufru) o koncentraci  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  byla připravena rozpuštěním 8,0 g NaOH v 1000 ml deionizované vody. Kyselá složka BR pufru o koncentraci  $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  byla připravena rozpuštěním 2,48 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2,81 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$  a 2,70 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  v 1000 ml deionizované vody. Pufry o daných hodnotách pH byly připravovány mísením kyselé a zásadité složky BR pufru.

Borátový pufr o pH 10,0 byl připraven smísením  $\text{H}_3\text{BO}_3$  o koncentraci  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  se zásaditou složkou BR pufru. Acetátový pufr o iontové síle  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a pH 4,6 byl připraven jako roztok obsahující 0,1 mol  $\text{CH}_3\text{COOH}$  a 0,1 mol  $\text{CH}_3\text{COONa}$  v 1000 ml deionizované vody.

Pitná voda byla získána z vodovodní sítě budovy Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Říční voda byla odebrána z Vltavy v oblasti Praha-Výtoň a před analýzou nebyla nijak upravena.

### 2.2 Aparatura

Pro všechna voltametrická měření byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro 5.1 (Polaro-Sensors, Praha). Software pracoval v operačním systému windows XP (Microsoft Corporation, USA).

Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení, ve kterém byla jako



referentní elektroda použita nasycená kalomelová elektroda typu RCE 103 a jako pomocná elektroda byla použita elektroda platinová (obě Monokrystaly, Turnov). Rychlost nárůstu potenciálu pro DCV i DPV techniku byla  $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Při DPV a AdSDPV byla šířka pulsu 100 ms a modulační amplituda  $-50 \text{ mV}$ .

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Agilent 8453 s ovládacím programem UV-Visible ChemStation 9.01, v křemenné kyvetě o měrné délce 1,0 cm. Software pracoval v operačním systému Windows 2000 (Microsoft Corporation, USA).

Veškerá měření pH byla prováděna na laboratorním pH metru Conductivity & pH Meter 4330 Jenway s kombinovanou skleněnou elektrodou (Jenway, Velká Británie). Přístroj byl kalibrován standardními kalibračními pufrů o pH 4,00, 7,00 a 10,00 (Radiometer, Dánsko).

## **2.3 Použité pracovní elektrody**

### **2.3.1 m-AgSAE**

Obavy z toxicity rtuti daly vzniknout novým elektrodovým materiálům na bázi pevného amalgámu, který je tvořen amalgamací jemného prášku příslušného kovu (Ag, Au, Ir, Cu, Bi). Tyto amalgámy představují čistší obdobu zubních amalgámů, o nichž je známo, že jsou zcela netoxické [47]. Podle stavu povrchu můžeme stříbrné amalgámové elektrody rozdělit na několik typů, např.: leštěná (p-AgSAE), filmová (MF-AgSAE), menisková (m-AgSAE). V této diplomové práci byla jako pracovní elektroda použita rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda (m-AgSAE).

Tato elektroda se snadno připraví naplněním skleněné trubičky práškovým stříbrem a ponořením přes noc do kapalné rtuti [48]. Vzniklý amalgám se mechanicky vyleští a takto vzniklá leštěná stříbrná pevná amalgámová elektroda (p-AgSAE) se krátce ponoří do kapalné rtuti [49]. Mezi výhody takto připravené elektrody patří například robustnost, nízký šum a vysoké přepětí vodíku, díky kterému je vhodná pro měření redukčních procesů. Široké potenciálové okno v oblasti negativních potenciálů dovoluje zaznamenávat na zmíněné elektrodě nejen přímou redukci analytu, ale i provádět předběžnou akumulaci vysoce elektronegativních kovů nacházejících se v roztoku v podobě iontů [50].

Kvůli snadnému rozpouštění materiálu elektrody při nízkých kladných potenciálech nenachází amalgámové elektrody velké využití pro sledování oxidačních procesů [51].

Hlavním problémem při používání amalgámové elektrody je pasivace elektrodového povrchu adsorbováním některé složky analytu, či produktu. Této skutečnosti se předchází

pravidelným mechanickým či elektrochemickým čištěním, založeným na následujících třech krocích [52].

*Amalgamace.* Tento proces byl prováděn jednou týdně, nebo pokud došlo k pasivaci povrchu elektrody. Spočívá v obnovení menisku ponořením elektrody do kapalně rtuti na dobu 15 s.

*Elektrochemická aktivace.* Aktivace byla prováděna na začátku každého měřicího dne, vždy po amalgamaci, nebo po krátkém přerušení práce. V roztoku KCl ( $c = 0,2 \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ ) je po dobu 300 s na elektrodu vkládáno napětí  $-2200 \text{ mV}$ . Po celou dobu aktivace je roztokem mícháno. Při tomto procesu dochází k odstranění adsorbovaných látek z povrchu elektrody a tím se zlepšuje citlivost měření.

*Regenerace.* Regenerace byla prováděna vždy před každým voltametrickým měřením přímo v analyzovaném roztoku. Na elektrodu byly po dobu 30 s střídavě vkládány regenerační potenciály  $E_{\text{reg},1}$  (kladnější regenerační potenciál) a  $E_{\text{reg},2}$  (zápornější regenerační potenciál) s délkou pulsu 0,1 s. Hodnoty regeneračních potenciálu je nutno nalézt experimentálně, ale obvykle odpovídají krajům potenciálového okna.

### 2.3.2 BDDFE

V poslední době se v elektroanalytické chemii prosazuje nový elektroodový materiál, a to borem dopovaná diamantová filmová elektroda [53]. Diamant se vyznačuje mimořádnou mechanickou a chemickou stabilitou. Je jedním z nejlepších přírodních izolátorů a pro jeho elektroanalytické využití je nutné jej dopovat atomy jiných prvků, nejčastěji atomy boru [54]. Podle koncentrace dopantu lze získat diamant s polovodivými nebo polokovovými vlastnostmi [55].

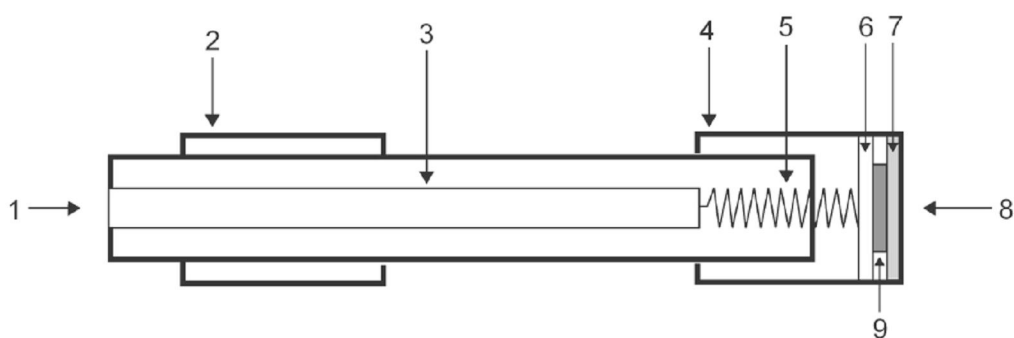
BDDFE jsou zpravidla připravovány metodou chemické depozice par, kdy je nejčastěji používána směs methan – vodík. Do této směsi plynů se poté přidává diboran. Většina BDD filmů vzniká na křemíkovém substrátu, ale kvůli jeho křehkosti jsou dnes testovány i jiné substráty pro BDD filmy, např. titan [56] či tantal [57].

Borem dopované diamantové filmové elektrody jsou hojně používány ke stanovení léčiv [58-60]. Dále také našly široké uplatnění pro stanovení aromatických aminů [61, 62].

Díky svým jedinečným vlastnostem nabízejí BDDFE široké využití v biomedicínské oblasti. V biologických matricích (moč, krevní plasma) je však elektroda náchylná k znečištění a následné deaktivaci. Tento problém je řešen vkládáním krátkých katodických anebo anodických pulzů na povrch elektrody [63].

Přestože BDDFE nemohou v katodické oblasti zcela nahradit elektrody na bázi rtuti, či v anodické oblasti elektrody na bázi skelného uhlíku, řada jejich vlastností je z hlediska elektrochemických senzorů mimořádně užitečná [49]. Mezi klady BDDFE patří například nízký šum, široké potenciálové okno, dosahující nejčastěji šíře až 3,5 V, dobrá odolnost vůči adsorpci polárních látek na povrch a následné pasivaci [64]. Mechanická robustnost a stabilita umožňuje využití BDDFE v průtokových systémech s elektrochemickou detekcí [65, 66].

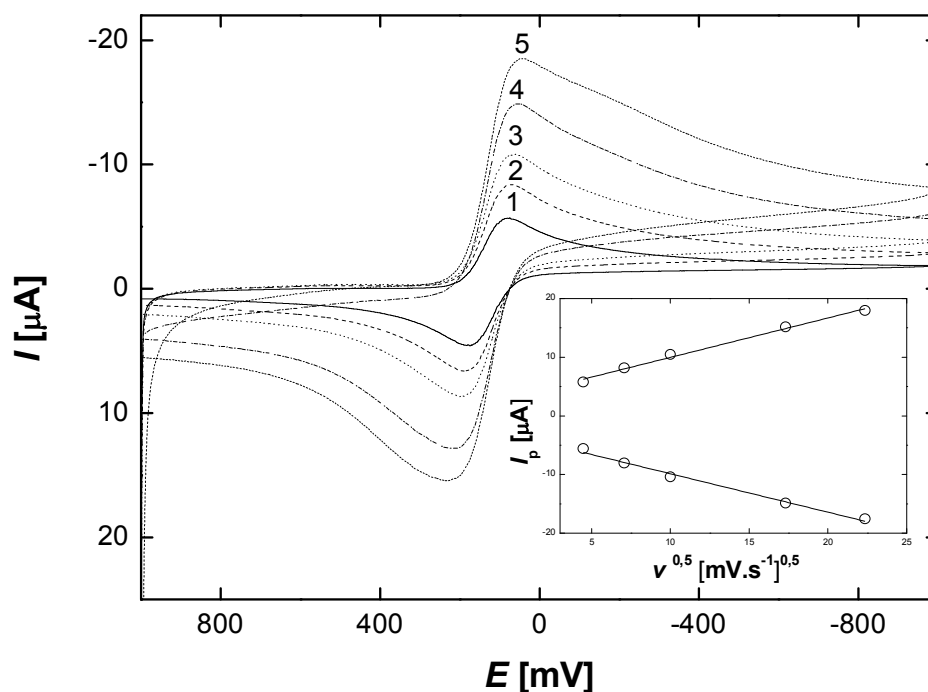
Na obr. 2.1 je znázorněno schéma BDDFE v diskovém uspořádání.



**Obr. 2.1** Schéma BDDFE v diskovém uspořádání: kontakt pro připojení k potenciostatu (1), teflonové tělo elektrody (2), elektrický kontakt (3), šroubovací nástavec (4), pružina (5), kovová destička z obou stran pokrytá grafitem (6), těsnění (7), kontakt s roztokem (8), BDDFE na křemíkové podložce (9) [64].

Povrch elektrody byl na začátku každého měřicího dne aktivován ponořením do roztoku  $\text{HNO}_3$  ( $c = 1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a po dobu 15 min bylo na elektrodu vkládáno napětí o velikosti 2500 mV. V průběhu aktivace bylo roztokem mícháno.

Po aktivaci byla testována elektrochemická aktivita elektrody v roztoku hexakynoželezitanu draselného ( $c = 1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) v KCl ( $c = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) při různých rychlostech polarizace (obr. 2.2). Velikosti proudu píků byly vyneseny proti druhé odmocnině z rychlosti polarizace. Lineární závislosti značí, že se jedná o děj kontrolovaný difuzí.



**Obr. 2.2** Cyklické voltamogramy hexakyanoželezitanu draselného ( $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) v KCl ( $c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) při různých rychlostech polarizace  $v$ : 20 (1), 50 (2), 100 (3), 200 (4), 500 (5)  $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . Vložena závislost proudů píků  $I_p$  na odmocnině z rychlosti polarizace  $v$ .

Bylo zjištěno, že elektroda vykazuje lepší stabilitu signálu, pokud jsou na ni před každým měřením vkládány regenerační potenciály. Regenerační potenciály byly zjišťovány experimentálně dle krajů potenciálového okna. Nejlepší účinnost vykazovaly kladné regenerační pulzy střídané s hodnotou 0 mV. Při kladném  $E_{\text{reg},2}$  byla elektroda znovu částečně aktivována. Regenerační potenciály  $E_{\text{reg},1}$  a  $E_{\text{reg},2}$  byly na elektrodu vkládány střídavě v pulzech o délce 0,1 s po dobu 30 s.

## 2.4 Pracovní postupy

Při voltametričeských měření bylo vždy do 10ml odměrné baňky odpipetováno příslušné množství zásobního roztoku 5-NI v deionizované vodě ( $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Poté byla baňka doplněna po rysku BR pufrům o příslušném pH. Základní elektrolyt odpovídal 10 ml čerstvě připraveného BR pufru o příslušném pH.

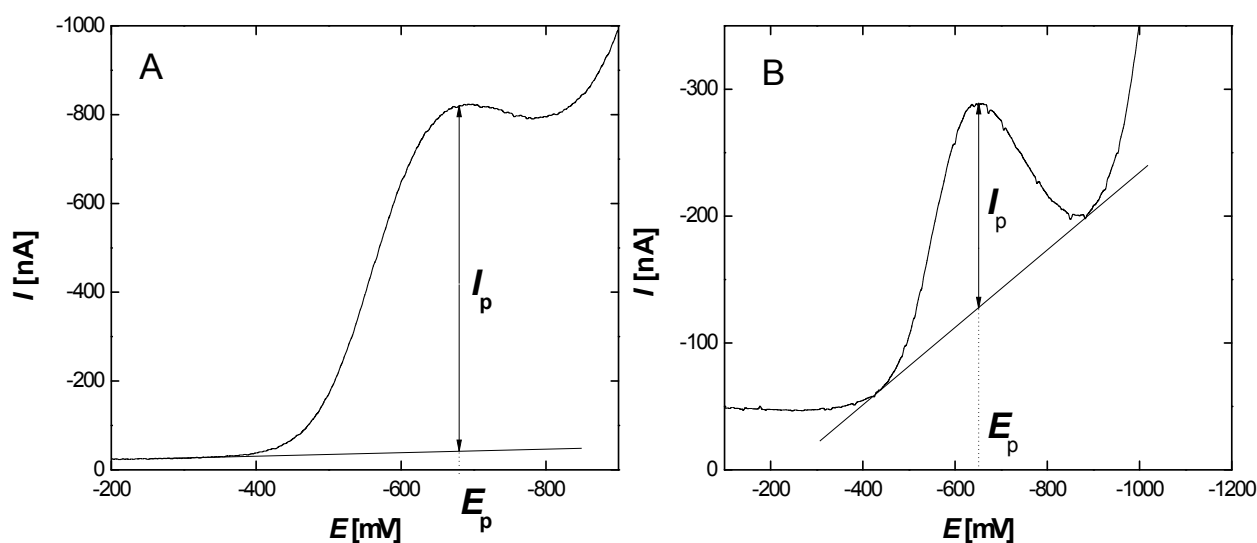
Připravený roztok byl promíchán a kvantitativně převeden do voltametričeské nádoby. Roztok byl probublán dusíkem (čistota 4.0, Linde, Praha) po dobu minimálně 5 min, aby se

odstranil přítomný kyslík. Před vstupem dusíku do voltametrické nádoby byla zařazena promývačka, naplněna deionizovanou vodou. Následně byly zaznamenány voltametrické křivky. Každá křivka byla zaznamenána třikrát a mezi každým měřením byl roztok krátce probublán dusíkem.

Pro proměření kalibračních závislostí v řádu  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  bylo příslušné množství zásobního roztoku 5-NI přidáváno přímo do ZE přidavky. Pro vyšší koncentrační řád byly roztoky připravovány vždy zvlášť, do 10ml odměrné baňky. Všechna měření byla provedena za laboratorní teploty.

## 2.5 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení získaných dat

Výška vlny u DCV byla měřena od přímky vzniklé prodloužením linie křivky voltamogramu před nástupem vlny. U DPV byla velikost píku měřena od spojnice minim po jeho stranách. Na obr. 2.3 jsou znázorněny způsoby vyhodnocení naměřených DC a DP voltamogramů.



**Obr. 2.3** Způsob vyhodnocování DC a DP voltamogramů 5-NI. DC voltamogram (A) a DP voltamogram (B) 5-NI ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřený na BDDFE bez regenerace, v prostředí BR pufru o pH 3,0.  $I_p$  značí proud píku a  $E_p$  potenciál píku.

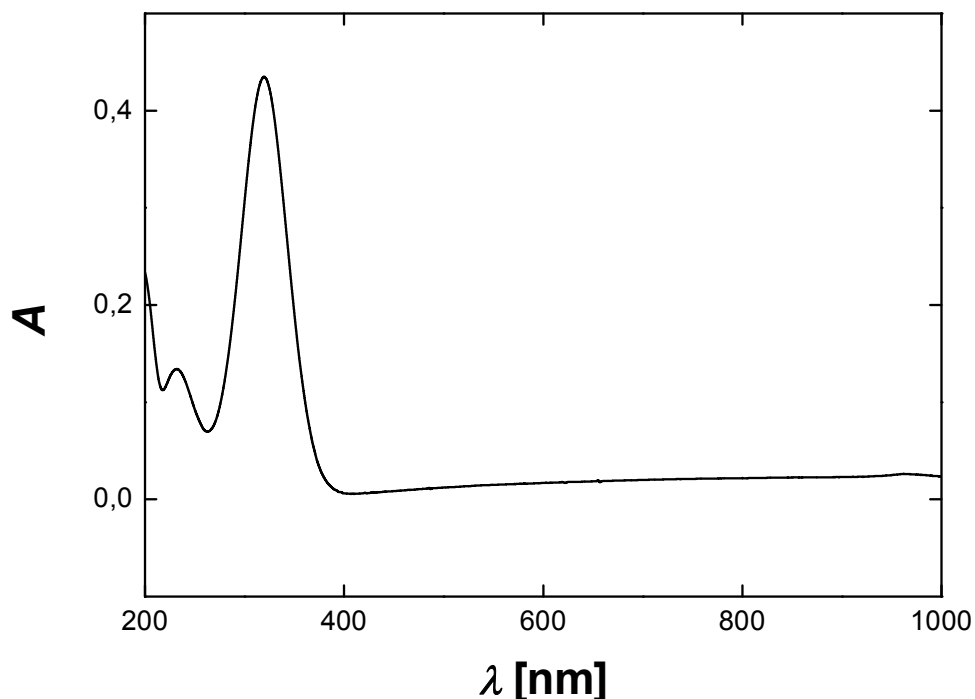
K provádění výpočtů, tvorbě grafů a statistického vyhodnocení uvedených v této práci byly použity programy OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, USA) a Microsoft Excel 2003

(Microsoft Corporation, USA). Pomocí programu OriginPro 8.5 byly u kalibračních přímek vyhodnoceny a sestrojeny konfidenční pásy (na hladině významnosti 0,05) [67].

Mez stanovitelnosti ( $L_Q$ ) byla vypočtena jako koncentrace odpovídající desetinásobku směrodatné odchylky deseti měření 5-NI o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky [68].

## 2.6 Stálost zásobního roztoku 5-NI

Stálost zásobního roztoku 5-NI ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) byla zjišťována spektrofotometricky v rozmezí vlnových délek 190 až 1000 nm. Absorbance byla měřena v křemenné kyvetě o měrné délce 1,0 cm proti deionizované vodě. Bylo zjištěno, že zásobní roztok je stálý po dobu minimálně 200 dní. Na obr. 2.4 je uvedeno absorpční spektrum 5-NI a v tab 2.1 jsou hodnoty absorbance v absorpčním maximu  $\lambda_{\text{max}} = 318 \text{ nm}$  změřené v průběhu několika měsíců.



**Obr. 2.4** Absorpční spektrum 5-NI ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřené v křemenné kyvetě o měrné délce 1,0 cm proti deionizované vodě.

**Tab. 2.1**

Stálost zásobního roztoku 5-NI ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Měřeno v křemenné kyvetě o měrné délce 1,0 cm proti deionizované vodě.  $A_{318}$  značí absorbanci 5-NI při  $\lambda_{\text{max}}$  a  $A_{\text{rel}}$  je relativní hodnota absorbance vztažená k absorbanci ze dne 0.

den	$A_{318}$	$A_{\text{rel}} [\%]$
0	0,434	100,0
1	0,434	100,0
3	0,435	100,2
5	0,435	100,2
30	0,434	100,0
100	0,433	99,8
200	0,433	99,8

### 3. VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 5-NITROIMIDAZOLU NA STŘÍBRNÉ PEVNÉ AMALGÁMOVÉ ELEKTRODĚ

#### 3.1 DC voltametrie 5-nitroimidazolu

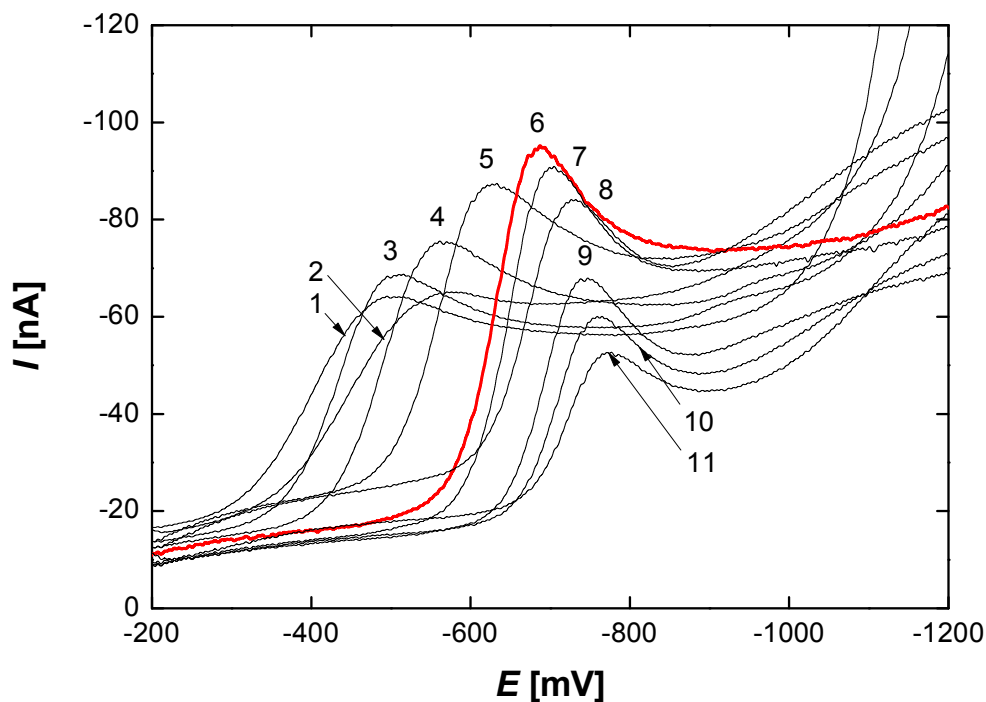
##### 3.1.1 Vliv pH

Bylo prostudováno voltametrické chování 5-NI technikou DCV na m-AgSAE v prostředích BR pufru o pH v rozmezí 2,0 až 12,0. Tato látka v celé oblasti pH poskytuje jeden dobře vyvinutý pík. Potenciál píku  $E_p$  se s vyšším pH posouvá k negativnějším potenciálům, z důvodu obtížněji probíhající redukce látky v prostředí s nižší koncentrací vodíkových iontů. Voltamogramy 5-NI ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) při různém pH jsou zobrazeny na obr. 3.1. Naměřené hodnoty  $I_p$  5-NI a  $E_p$  5-NI v závislosti na pH jsou uvedeny v tab. 3.1. Grafická závislost  $E_p$  5-NI na pH je pak znázorněna na obr. 3.2.

Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu píku  $E_p$  5-NI na pH roztoku v rozmezí hodnot 7,0 až 12,0 vypočten vztah (2):

$$E_p [\text{mV}] = -17,8 \cdot \text{pH} - 567,1 \quad (R = -0,9978) \quad (2)$$



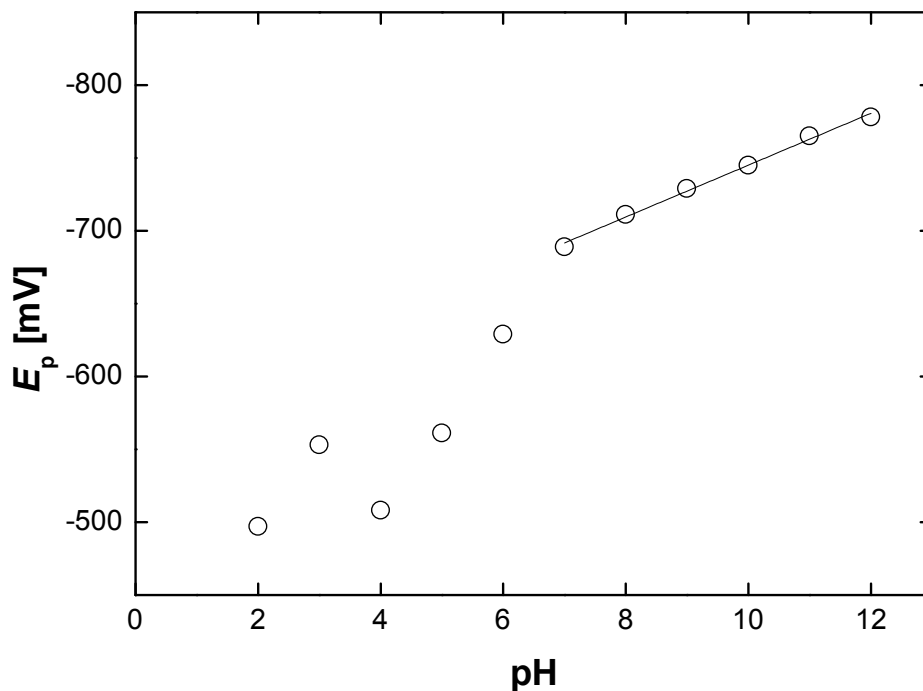


**Obr. 3.1** Voltamogramy 5-NI ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřené technikou DCV na m-AgSAE bez regenerace v prostředí BR pufru o pH 2,0 (1); 3,0 (2); 4,0 (3); 5,0 (4); 6,0 (5); 7,0 (6); 8,0 (7); 9,0 (8); 10,0 (9); 11,0 (10) a 12,0 (11). Zvolené optimální prostředí reprezentuje červená křivka.

**Tab. 3.1**

Závislost proudu píku  $I_p$  a potenciálu píku  $E_p$  5-NI na pH měřená technikou DCV na m-AgSAE bez regenerace v prostředí BR pufru. Experimentální podmínky stejné jako u obr. 3.1.

pH	$I_p$ [nA]	$E_p$ [mV]
2,0	-43,5	-497
3,0	-33,9	-553
4,0	-44,1	-508
5,0	-52,1	-561
6,0	-53,5	-629
7,0	-69,3	-689
8,0	-67,1	-711
9,0	-50,3	-729
10,0	-49,0	-745
11,0	-39,6	-765
12,0	-27,9	-778



**Obr. 3.2** Závislost potenciálu píku  $E_p$  5-NI na pH měřená metodou DCV na m-AgSAE bez regenerace v prostředí BR pufru. Experimentální podmínky stejné jako u obr. 3.1.

Nejvyšší pík 5-NI byl získán v prostředí BR pufru o pH 7,0, při tomto pH byla vyhovující opakovatelnost ( $s_r = 11,3\%$ ). Pro následující měření koncentračních závislostí technikou DCV na m-AgSAE bylo na základě získaných výsledků zvoleno jako optimální prostředí BR pufr o pH 7,0.

### 3.1.2 Vliv regeneračních potenciálů

Dále byly hledány optimální regenerační potenciály  $E_{reg,1}$  a  $E_{reg,2}$ . Bylo provedeno vždy 20 měření pro různě zvolené hodnoty regeneračních potenciálů a byla vypočtena relativní směrodatná odchylka ( $s_r$ ) jako míra opakovatelnosti stanovení. Následující tabulka (tab. 3.2) porovnává získané výsledky.

**Tab. 3.2**

Relativní směrodatné odchylky pro různé dvojice vkládaných regeneračních potenciálů  $E_{\text{reg},1}$  a  $E_{\text{reg},2}$  na m-AgSAE. Měřeno technikou DCV v prostředí BR pufru o pH 7,0, Počet měření  $n = 20$ .  $c(5\text{-NI}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

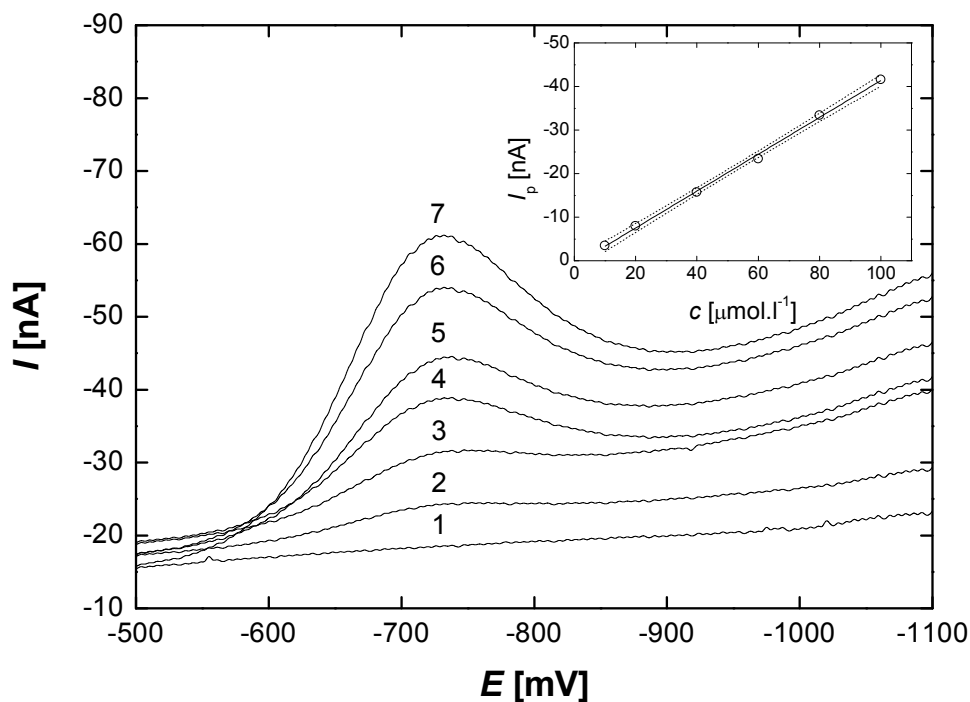
$E_{\text{reg},1} [\text{mV}]$	$E_{\text{reg},2} [\text{mV}]$	$s_r [\%]$
– <sup>a</sup>	– <sup>a</sup>	11,3
0	–800	3,4
0	–1500	9,0
–300	–800	6,7
–300	–1500	6,0

a – bez regenerace

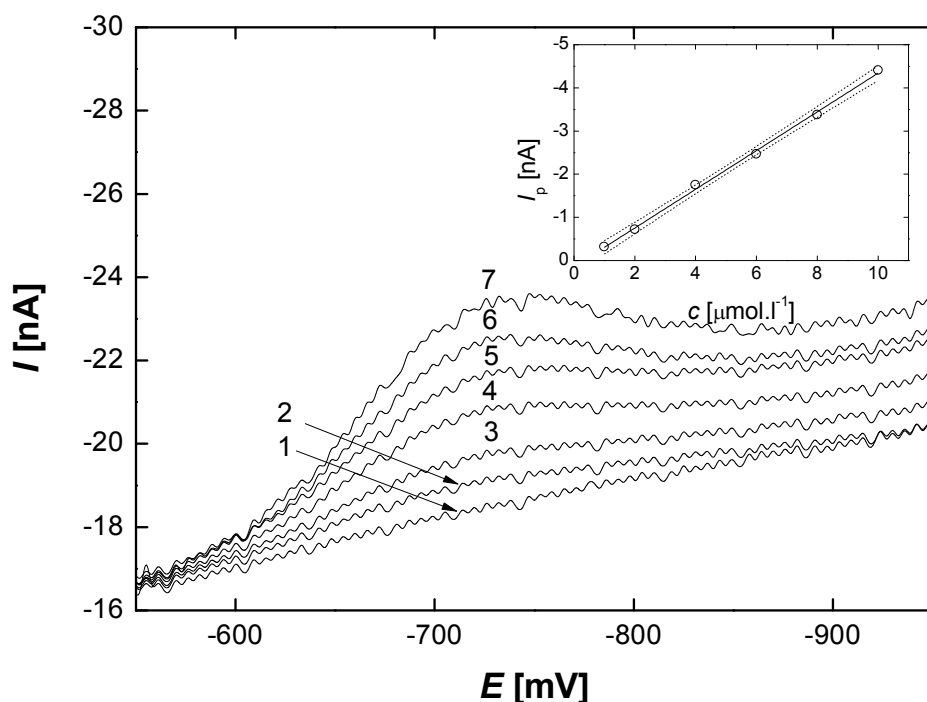
Na základě získaných výsledků lze shrnout, že optimální podmínky pro stanovení 5-NI technikou DCV na m-AgSAE jsou prostředí BR pufru o pH 7,0 a vkládané regenerační potenciály 0 a –800 mV.

### 3.1.3 Koncentrační závislosti

Technikou DCV byly proměřeny závislosti proudu píků  $I_p$  na koncentraci 5-NI. Na m-AgSAE byly vkládány regenerační potenciály ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -800 \text{ mV}$ ) a měřeno bylo v prostředí BR pufru o pH 7,0. Koncentrační závislosti byly proměřeny v rozmezí  $(1-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (obr. 3.3) a  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (obr. 3.4).



**Obr. 3.3** Voltamogramy 5-NI naměřené technikou DCV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -800 \text{ mV}$ ) v prostředí BR pufru o pH 7,0, v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .  $c(5\text{-NI})$ : 0 (1);  $1 \cdot 10^{-5}$  (2);  $2 \cdot 10^{-5}$  (3);  $4 \cdot 10^{-5}$  (4);  $6 \cdot 10^{-5}$  (5);  $8 \cdot 10^{-5}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-5}$  (7)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vložena závislost proudu píků  $I_p$  5-NI na koncentraci 5-NI. Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .



**Obr. 3.4** Voltamogramy 5-NI naměřené technikou DCV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -800 \text{ mV}$ ) v prostředí BR pufr o pH 7,0, v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .  $c(5\text{-NI})$ : 0 (1);  $1 \cdot 10^{-6}$  (2);  $2 \cdot 10^{-6}$  (3);  $4 \cdot 10^{-6}$  (4);  $6 \cdot 10^{-6}$  (5);  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-6}$  (7)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vložena závislost proudu píků  $I_p$  5-NI na koncentraci 5-NI. Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Pro oba koncentrační řády byla závislost výšky píku  $I_p$  na koncentraci 5-NI lineární. Parametry kalibračních závislostí a dosažené meze stanovitelnosti jsou uvedeny v tab. 3.3.

**Tab. 3.3**

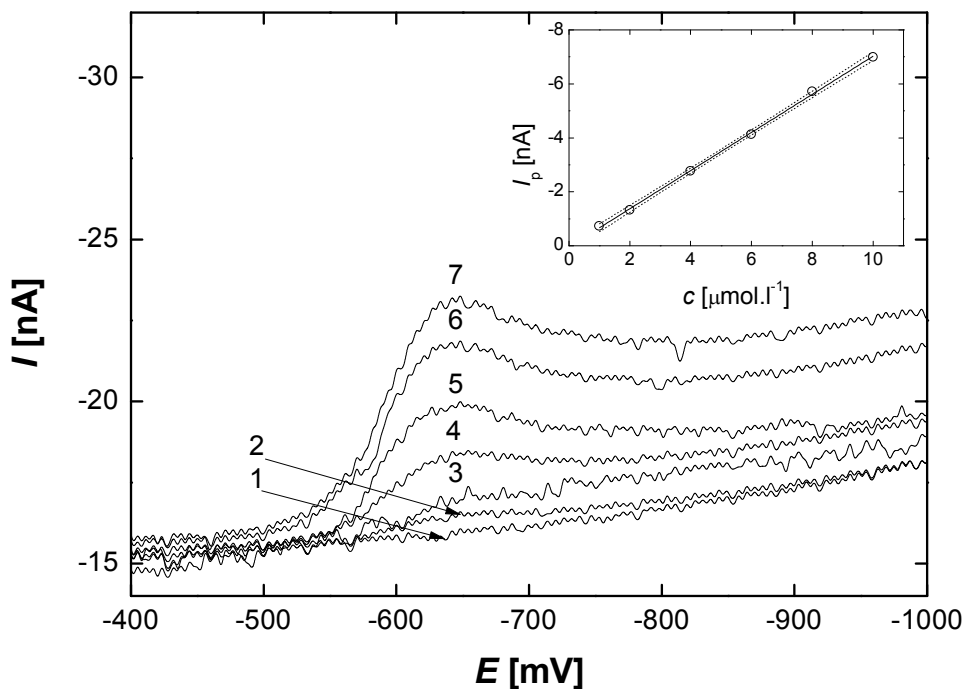
Parametry kalibračních křivek pro stanovení 5-NI technikou DCV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -800 \text{ mV}$ ) v prostředí BR pufru o pH 7,0.

Koncentrace [mol·l <sup>-1</sup> ]	Směrnice [mA·l·mol <sup>-1</sup> ]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	$L_Q$ [mol·l <sup>-1</sup> ]
$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-0,42 \pm 0,01$	$0,93 \pm 0,49$	-0,9993	—
$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$-0,45 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,06$	-0,9989	$1,0 \cdot 10^{-6}$

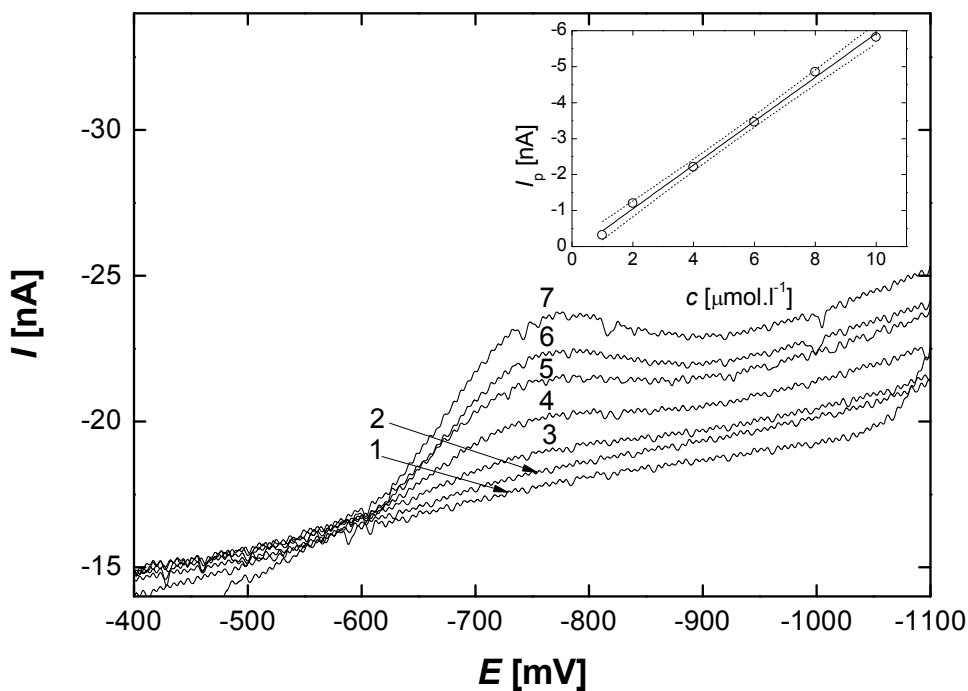
### 3.1.4 Stanovení 5-NI v modelových vzorcích pitné a říční vody

Byly proměřeny kalibrační závislosti 5-NI metodou DCV na m-AgSAE v pitné i říční vodě v rozmezí koncentrací  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Pro stanovení v obou matricích byly použity dříve zjištěné optimální podmínky (BR pufr o pH 7,0 a vkládané regenerační potenciály  $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -800 \text{ mV}$ ). Roztoky byly připraveny odpipetováním vždy 9,0 ml modelového vzorku vody (voda s přidavkem příslušného množství 5-NI) do 10ml baňky a baňka byla poté doplněna po rysku BR pufru o pH 7,0 (faktor ředění tedy činil 0,9).

Na obr. 3.5 jsou zobrazeny voltamogramy 5-NI v měřeném vzorku pitné vody v koncentračním rozmezí  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Na obr. 3.6 jsou zaznamenány voltamogramy 5-NI pro stejné koncentrační rozmezí v prostředí vody říční. Parametry koncentračních závislostí jsou shrnuty v tab. 3.4.



**Obr. 3.5** Voltamogramy 5-NI naměřené metodou DCV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -800 \text{ mV}$ ) v modelovém vzorku (pitná voda – BR pufr o pH 7,0 (9:1)), v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .  $c(5\text{-NI v pitné vodě})$ : 0 (1);  $1 \cdot 10^{-6}$  (2);  $2 \cdot 10^{-6}$  (3);  $4 \cdot 10^{-6}$  (4);  $6 \cdot 10^{-6}$  (5);  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-6}$  (7)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vloženy závislosti proudu píků  $I_p$  5-NI na koncentraci 5-NI. Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .



**Obr. 3.6** Voltamogramy 5-NI naměřené metodou DCV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -800 \text{ mV}$ ) v modelovém vzorku (říční voda – BR pufr o pH 7,0 (9:1)), v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .  $c(5\text{-NI v říční vodě})$ : 0 (1);  $1 \cdot 10^{-6}$  (2);  $2 \cdot 10^{-6}$  (3);  $4 \cdot 10^{-6}$  (4);  $6 \cdot 10^{-6}$  (5);  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-6}$  (7)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vloženy závislosti proudu píků  $I_p$  5-NI na koncentraci 5-NI. Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Pro oba kalibrační řády v obou modelových maticích byly kalibrační závislosti lineární. Parametry těchto závislostí jsou shrnuty v tab. 3.4.

**Tab. 3.4**

Parametry kalibračních křivek pro stanovení 5-NI metodou DCV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -800 \text{ mV}$ ) v modelových vzorcích pitné a říční vody.

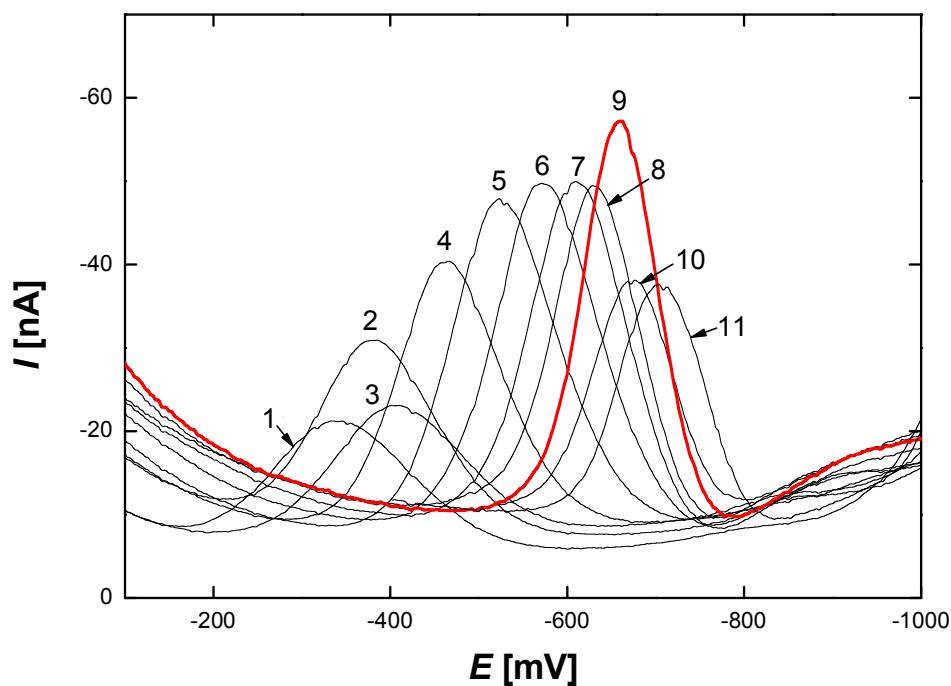
voda	Koncentrace [mol·l <sup>-1</sup> ]	Směrnice [mA·l·mol <sup>-1</sup> ]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	$L_Q$ [mol·l <sup>-1</sup> ]
pitná	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-0,55 \pm 0,01$	$-1,78 \pm 0,59$	-0,9994	—
	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$-0,71 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,06$	-0,9996	$1,4 \cdot 10^{-6}$
říční	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-0,53 \pm 0,01$	$-1,05 \pm 0,71$	-0,9990	—
	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$-0,61 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,11$	-0,9983	$8,0 \cdot 10^{-7}$

### 3.2 Diferenční pulzní voltametrie 5-nitroimidazolu

#### 3.2.1 Vliv pH

Vliv pH na chování 5-NI ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) při DPV na m-AgSAE byl sledován v prostředích BR pufru o pH v rozmezí 2,0 až 12,0. Látka opět poskytuje jeden dobře vyvinutý pík v celé oblasti pH. Potenciál píku 5-NI se s rostoucím pH vodného roztoku BR pufru též posouval ve směru negativnějších potenciálů. Získané voltamogramy 5-NI pro různé hodnoty pH jsou zobrazeny na obr. 3.7. Naměřené hodnoty  $I_p$  5-NI a  $E_p$  5-NI v závislosti na pH jsou uvedeny v tab. 3.5. Grafická závislost  $E_p$  5-NI na pH je pak znázorněna na obr. 3.8. Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu píku  $E_p$  5-NI na pH roztoku v rozmezí hodnot 7,0 až 12,0 vypočten vztah (3):

$$E_p [\text{mV}] = -24,3 \cdot \text{pH} - 413,6 \quad (R = -0,9970) \quad (3)$$



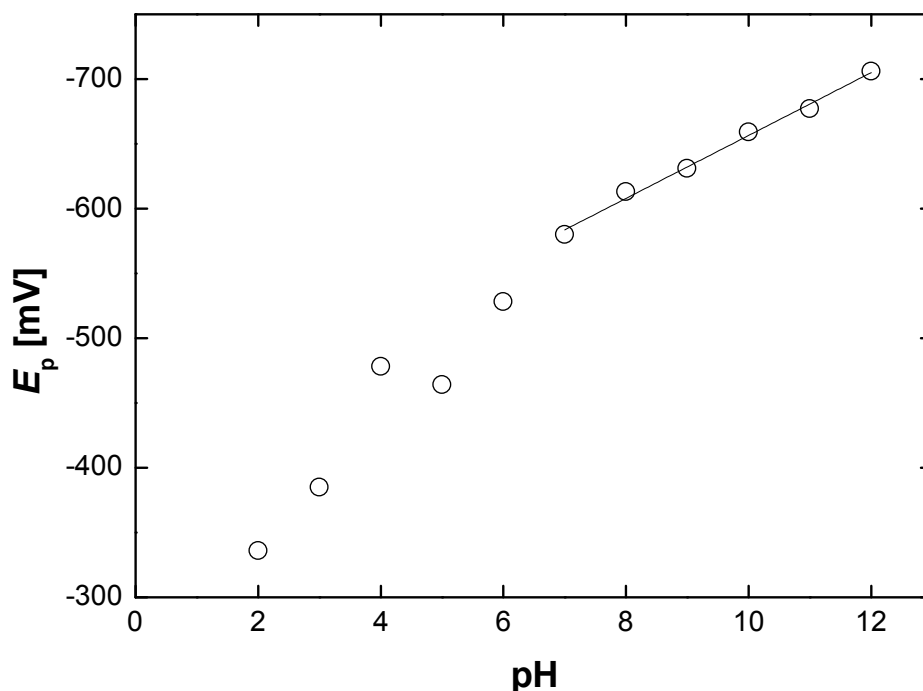
**Obr. 3.7** Voltamogramy 5-NI ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřené technikou DPV na m-AgSAE bez regenerace v prostředí BR pufru o pH 2,0 (1); 3,0 (2); 4,0 (3); 5,0 (4); 6,0 (5); 7,0 (6); 8,0 (7); 9,0 (8); 10,0 (9); 11,0 (10) a 12,0 (11). Zvolené optimální prostředí reprezentuje červená křivka.

**Tab. 3.5**

Závislost proudu píku  $I_p$  a potenciálu píku  $E_p$  5-NI na pH měřená metodou DPV na m-AgSAE bez regenerace v prostředí BR pufru. Experimentální podmínky stejné jako u obr. 3.6.

pH	$I_p$ [nA]	$E_p$ [mV]
2,0	-12,7	-336
3,0	-20,2	-385
4,0	-15,4	-478
5,0	-30,5	-464
6,0	-38,2	-528
7,0	-41,0	-580
8,0	-40,6	-613
9,0	-39,7	-631
10,0	-47,2	-659
11,0	-26,4	-677
12,0	-25,8	-706





**Obr. 3.8** Závislost potenciálu píku  $E_p$  5-NI na pH měřená technikou DPV na m-AgSAE bez regenerace v prostředí BR pufru. Experimentální podmínky stejné jako u obr. 3.6.

Hodnoty  $I_p$  naměřené při pH 10,0 byly nejvyšší a vykazovaly dobrou opakovatelnost ( $s_r = 7,9 \%$ ). Pro následující měření koncentračních závislostí technikou DPV na m-AgSAE bylo tedy zvoleno jako optimální prostředí BR pufru o pH 10,0.

### 3.2.2 Vliv regeneračních potenciálů

Pro techniku DPV na m-AgSAE byly hledány optimální regenerační potenciály  $E_{reg,1}$  a  $E_{reg,2}$  stejným způsobem jako pro techniku DCV. Pro různé dvojice regeneračních potenciálů byly opět vypočteny relativní směrodatné odchylky. Výsledky jsou shrnuty v tabulce tab. 3.6.

**Tab. 3.6**

Relativní směrodatné odchylky pro různé dvojice vkládaných regeneračních potenciálů  $E_{reg,1}$  a  $E_{reg,2}$  na m-AgSAE. Měřeno technikou DPV v prostředí BR pufru o pH 10,0. Počet měření  $n = 20$ .  $c(5-NI) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

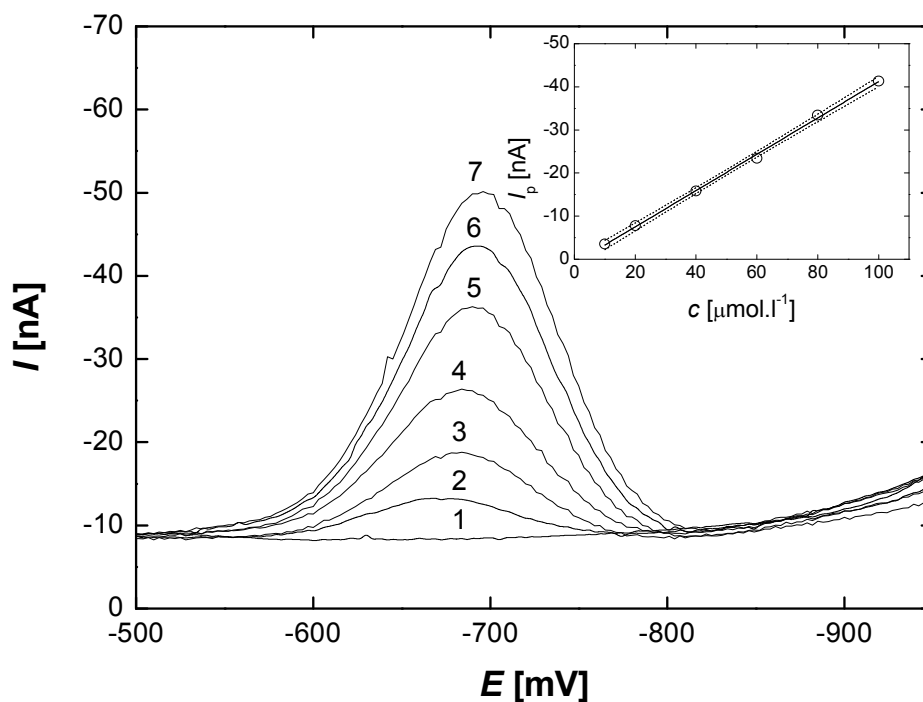
$E_{reg,1}$ [mV]	$E_{reg,2}$ [mV]	$s_r$ [%]
– <sup>a</sup>	– <sup>a</sup>	7,9
0	–800	3,8
0	–1500	6,6
–500	–800	8,6
–500	–1500	9,4

a – bez regenerace

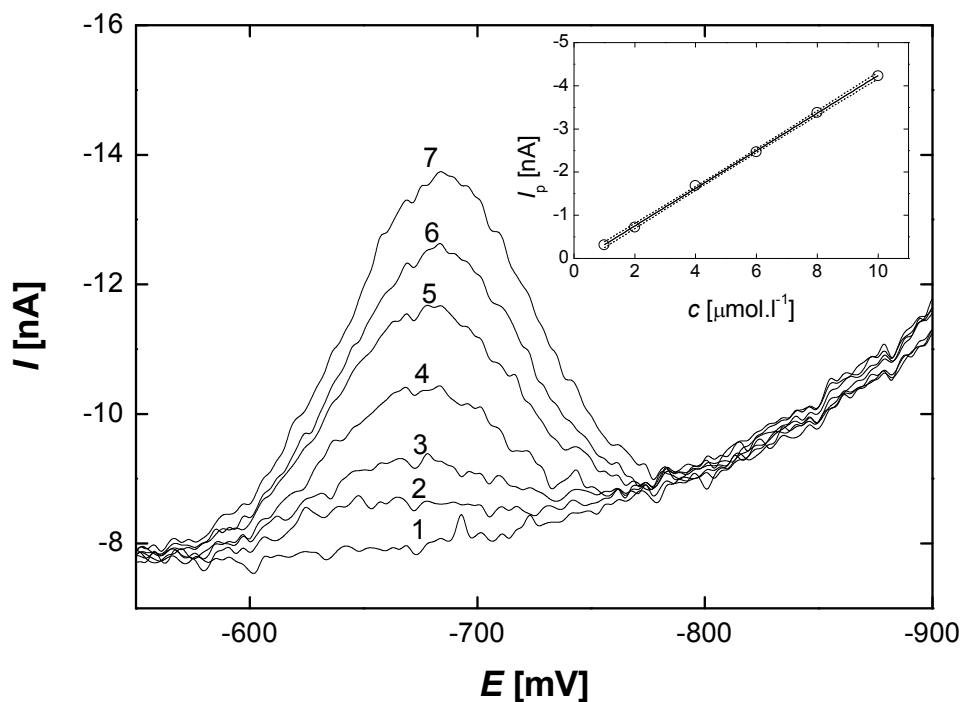
Na základě získaných výsledků byly stanoveny optimální podmínky pro stanovení 5-NI technikou DPV na m-AgSAE. Jako optimální prostředí byl vybrán BR pufru o pH 10,0 a regenerační potenciály vkládané na pracovní elektrodu 0 a  $-800$  mV.

### 3.2.3 Koncentrační závislosti

Závislosti proudu píků  $I_p$  na koncentraci byly proměřeny technikou DPV na m-AgSAE s vloženými regeneračními potenciály ( $E_{\text{reg},1} = 0$  mV,  $E_{\text{reg},2} = -800$  mV) v prostředí BR pufru o pH 10,0. Proměřeny byly koncentrační závislosti v rozmezí  $(1-10) \cdot 10^{-5}$  mol $\cdot$ l $^{-1}$  (obr. 3.9) a  $(1-10) \cdot 10^{-6}$  mol $\cdot$ l $^{-1}$  (obr. 3.10). Parametry naměřených kalibračních závislostí jsou uvedeny v tab. 3.7.



**Obr. 3.9** Voltamogramy 5-NI naměřené technikou DPV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0$  V,  $E_{\text{reg},2} = -800$  mV) v prostředí BR pufru o pH 10,0, v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-5}$  mol $\cdot$ l $^{-1}$ .  $c(5\text{-NI})$ : 0 (1);  $1 \cdot 10^{-5}$  (2);  $2 \cdot 10^{-5}$  (3);  $4 \cdot 10^{-5}$  (4);  $6 \cdot 10^{-5}$  (5);  $8 \cdot 10^{-5}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-5}$  (7) mol $\cdot$ l $^{-1}$ . Vložena závislost proudu píků  $I_p$  5-NI na koncentraci 5-NI. Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .



**Obr. 3.10** Voltamogramy 5-NI naměřené technikou DPV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -800 \text{ mV}$ ) v prostředí BR pufru o pH 10,0, v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .  $c(5\text{-NI})$ : 0 (1);  $1 \cdot 10^{-6}$  (2);  $2 \cdot 10^{-6}$  (3);  $4 \cdot 10^{-6}$  (4);  $6 \cdot 10^{-6}$  (5);  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-6}$  (7)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vložena závislost proudu píků  $I_p$  5-NI na koncentraci 5-NI. Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

**Tab. 3.7**

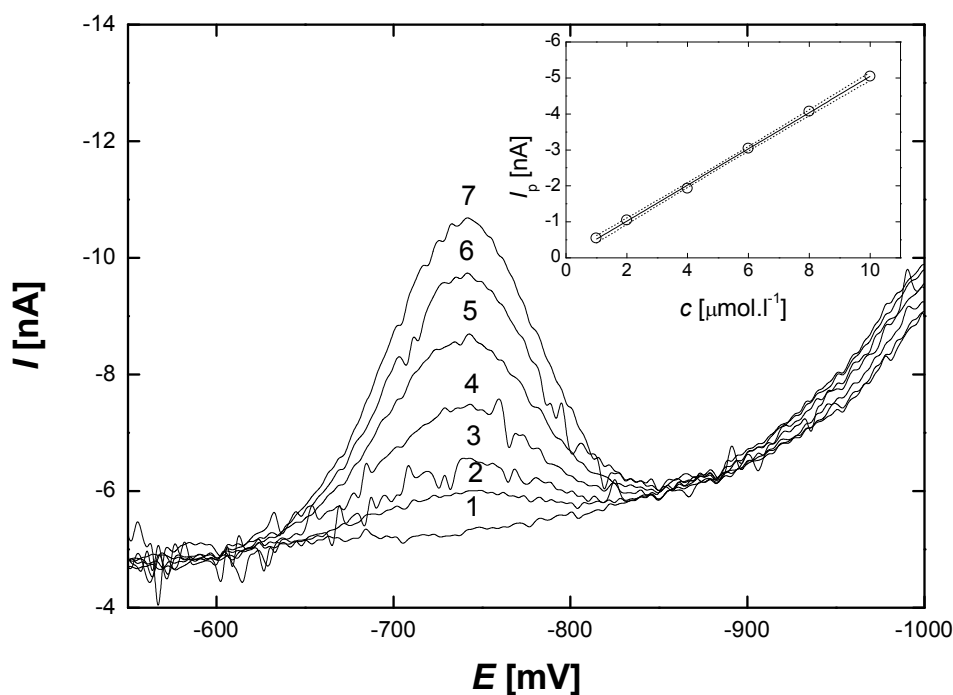
Parametry kalibračních křivek pro stanovení 5-NI technikou DPV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -800 \text{ mV}$ ) v prostředí BR pufru o pH 10,0.

Koncentrace [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]	Směrnice [ $\text{mA} \cdot \text{l} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	$L_Q$ [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]
$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-0,42 \pm 0,01$	$0,92 \pm 0,45$	$-0,9994$	—
$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$-0,43 \pm 0,00$	$0,12 \pm 0,03$	$-0,9998$	$1,5 \cdot 10^{-6}$

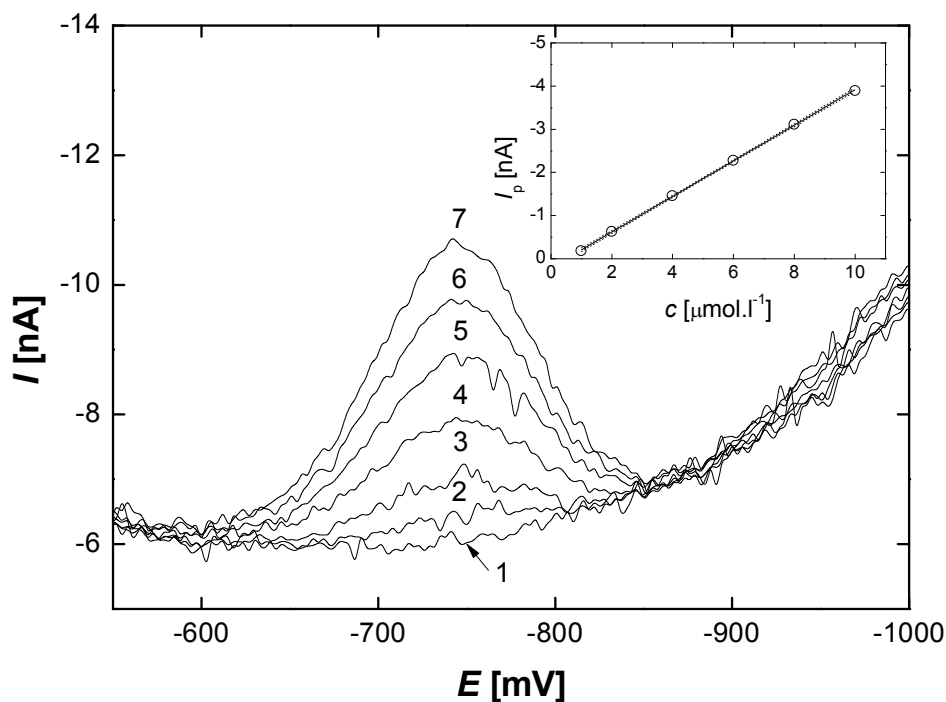
### 3.2.4 Stanovení 5-NI v modelových vzorcích pitné a říční vody

Aplikovatelnost nově vyvinuté metody byla ověřena proměřením kalibračních závislostí 5-NI pomocí DPV na m-AgSAE v modelových vzorcích pitné i říční vody v rozmezí koncentrací  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ . Pro zjednodušení celé procedury bylo přistoupeno k nahrazení čtyřsložkového BR pufru pufrům dvousložkovým tak, aby bylo zachováno výsledné pH pufru. Jako vhodná náhrada byl použit  $0,1 \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$  borátový pufr o pH 10,0. Roztoky byly připraveny odpipetováním vždy 9,0 ml modelového vzorku vody (voda s přídavkem příslušného množství 5-NI) do 10ml baňky a baňka byla poté doplněna po rysku borátovým pufrům o pH 10,0 (faktor ředění tedy činil 0,9).

Na obr. 3.11 jsou zobrazeny voltamogramy 5-NI v prostředí pitné vody v koncentračním rozmezí  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ . Na obr. 3.12 jsou zaznamenány voltamogramy 5-NI pro stejné koncentrační rozmezí v prostředí vody říční. Parametry koncentračních závislostí jsou shrnuty v tab. 3.8.



**Obr. 3.11** Voltamogramy 5-NI naměřené metodou DPV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -800 \text{ mV}$ ) v modelovém vzorku (pitná voda – borátový pufr o pH 10,0 (9:1)), v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ .  $c(5\text{-NI v pitné vodě})$ : 0 (1);  $1 \cdot 10^{-6}$  (2);  $2 \cdot 10^{-6}$  (3);  $4 \cdot 10^{-6}$  (4);  $6 \cdot 10^{-6}$  (5);  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-6}$  (7)  $\text{mol} \cdot \Gamma^{-1}$ . Vloženy závislosti proudu píků  $I_p$  5-NI na koncentraci 5-NI. Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .



**Obr. 3.12** Voltamogramy 5-NI naměřené metodou DPV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -800 \text{ mV}$ ) v modelovém vzorku (říční voda – borátový pufr o pH 10,0 (9:1)), v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .  $c(5\text{-NI v říční vodě})$ : 0 (1);  $1 \cdot 10^{-6}$  (2);  $2 \cdot 10^{-6}$  (3);  $4 \cdot 10^{-6}$  (4);  $6 \cdot 10^{-6}$  (5);  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-6}$  (7)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vloženy závislosti proudu píků  $I_p$  5-NI na koncentraci 5-NI. Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

**Tab. 3.8**

Parametry kalibračních křivek pro stanovení 5-NI metodou DPV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -800 \text{ mV}$ ) v modelových vzorcích pitné a říční vody.

voda	Koncentrace [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]	Směrnice [ $\text{mA} \cdot \text{l} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	$L_Q$ [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]
pitná	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-0,41 \pm 0,01$	$-1,11 \pm 0,43$	-0,9994	—
	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$-0,50 \pm 0,01$	$-0,01 \pm 0,04$	-0,9996	$7,0 \cdot 10^{-7}$
říční	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-0,39 \pm 0,01$	$-0,37 \pm 0,35$	-0,9996	—
	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$-0,41 \pm 0,00$	$-0,20 \pm 0,02$	-0,9999	$1,1 \cdot 10^{-6}$

### 3.2.5 Adsorpční rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie 5-NI

Ve snaze o další snížení získaných mezí stanovitelnosti 5-NI byla použita technika využívající adsorpci analytu na povrch elektrody kombinovanou s následným DPV stanovením – adsorpční rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie (AdSDPV). Vliv pH na voltametrické chování 5-NI byl studován v prostředích BR pufru o pH 3, 7 a 10. Roztok byl připraven smísením 1,0 ml zásobního roztoku 5-NI ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) s 9,0 ml příslušného BR pufru. Při každém měření byly použity optimální regenerační potenciály ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -800 \text{ mV}$ ). Hodnota potenciálu akumulace ( $E_{\text{reg}}$ ) byla volena jako potenciál píku  $E_p$  a dále jako  $E_p + (100 \text{ až } 400) \text{ mV}$ . Doba akumulace byla vždy 60 s.

Při zkoumání závislosti výšky píku 5-NI na potenciálu akumulace nebylo pozorováno významné zvýšení odezvy. Míra akumulace tedy nebyla dostatečná a pro snížení meze stanovitelnosti 5-NI nelze tuto techniku použít.

## 4. VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 5-NITROIMIDAZOLU NA BOREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODĚ

### 4.1 DC voltametrie 5-nitroimidazolu

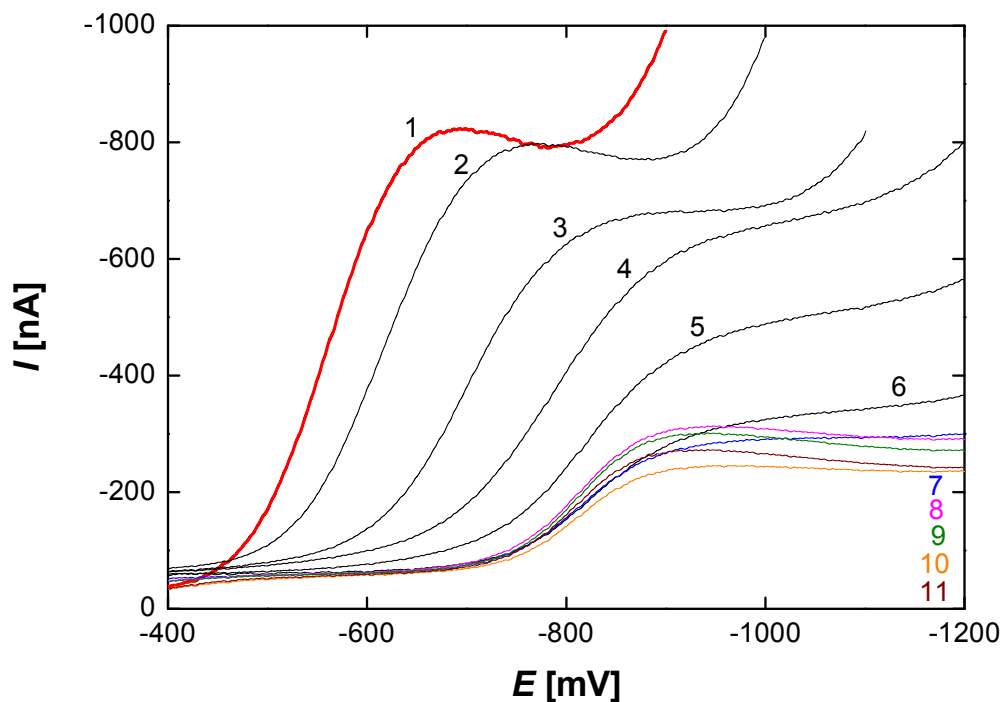
#### 4.1.1 Vliv pH

Pomocí techniky DCV na BDDFE bylo prostudováno voltametrické chování 5-NI v prostředích BR pufru o pH v rozmezí 2,0 až 12,0. 5-NI v celé oblasti pH látka poskytuje jeden pík, jehož potenciál se s rostoucím pH posouvá k negativnějším potenciálům. V rozmezí pH 5,0 až 7,0 se potenciál píku nemění a pro zásaditá pH se pík mírně posouvá ke kladnějším potenciálům. Tato skutečnost je způsobena rozdílným mechanismem redukce v prostředích o různé koncentraci vodíkových iontů. V kyselém prostředí dochází k ireverzibilní čtyřelektronové redukci nitroskupiny na hydroxylamin. V zásaditém prostředí probíhá redukce ve dvou krocích splývajících v jeden voltametrický pík. Nejprve dochází k rychlému reverzibilnímu přijetí jednoho elektronu za vzniku radikál aniontu. Následuje pomalá tříelektrodová ireverzibilní redukce. Stabilita radikál aniontu je silně zvýšena v prostředí s nedostatkem vodíkových iontů. V kyselém prostředí je rychlost určujícím krokem redukce přijetí druhého elektronu, kterému v této oblasti předchází reakce s vodíkovým iontem. V alkalické oblasti je rychlost určujícím krokem rychlá jednoelektronová redukce, která nevyžaduje protony. Proto se v alkalickém prostředí potenciál píku na pH tolik nemění [19].

Voltamogramy 5-NI ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) při různém pH jsou zobrazeny na obr. 4.1. Závislost výšky píků  $I_p$  5-NI a  $E_p$  5-NI na pH jsou uvedeny v tab. 4.1. Grafická závislost  $E_p$  5-NI na pH je zobrazena na obr. 4.2. Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu píku  $E_p$  5-NI na pH roztoku v rozmezí hodnot 1,0 až 4,0 vypočten vztah (4) a pro rozmezí hodnot 5,0 až 12,0 vztah (5)

$$E_p [\text{mV}] = -106,9 \cdot \text{pH} - 456,1 \quad (R = -0,9950) \quad (4)$$

$$E_p [\text{mV}] = 14,5 \cdot \text{pH} - 1090,0 \quad (R = 0,9655) \quad (5)$$



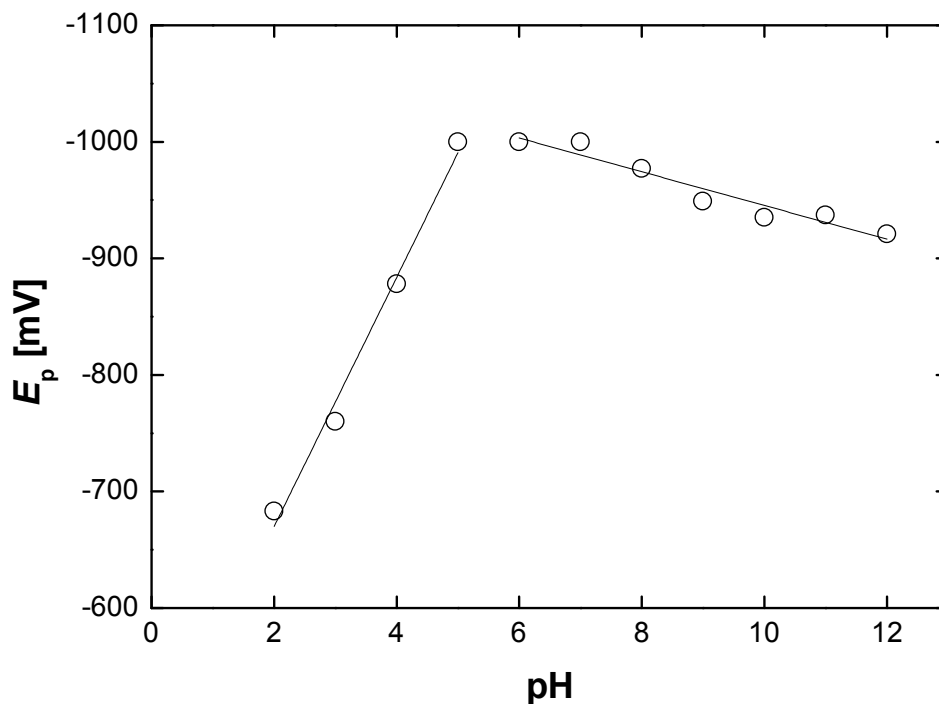
**Obr. 4.1** Voltamogramy 5-NI ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřené technikou DCV na BDDFE bez regenerace v prostředí BR pufru o pH 2,0 (1); 3,0 (2); 4,0 (3); 5,0 (4); 6,0 (5); 7,0 (6); 8,0 (7); 9,0 (8); 10,0 (9); 11,0 (10) a 12,0 (11). Zvolené optimální prostředí reprezentuje červená křivka.

**Tab. 4.1**

Závislost proudu píku  $I_p$  a potenciálu píku  $E_p$  5-NI na pH měřená technikou DCV na BDDFE bez regenerace v prostředí BR pufru. Experimentální podmínky shodné jako u obr. 4.1.

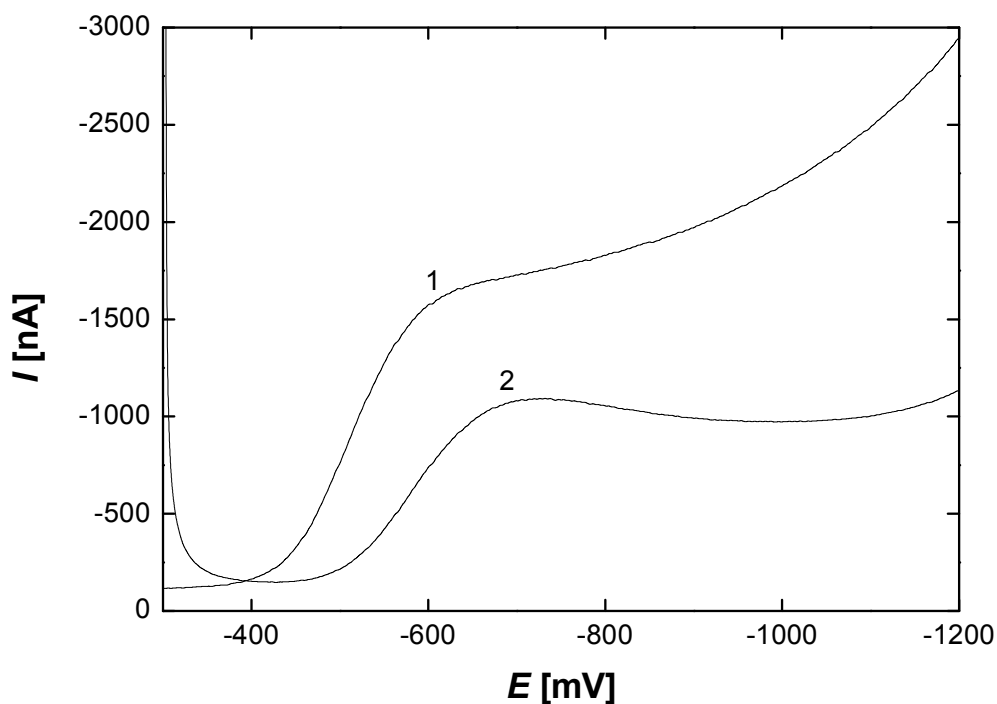
pH	$I_p$ [nA]	$E_p$ [mV]
2,0	-775,5	-683
3,0	-707,6	-760
4,0	-570,0	-878
5,0	-560,8	-1000
6,0	-403,2	-1000
7,0	-253,4	-1000
8,0	-209,7	-977
9,0	-231,0	-949
10,0	-219,9	-935
11,0	-162,4	-937
12,0	-191,2	-921





**Obr. 4.2** Závislost potenciálu píku  $E_p$  5-NI na pH měřená technikou DCV na BDDFE bez regenerace v prostředí BR pufru. Experimentální podmínky shodné jako u obr. 4.1.

Hodnoty  $I_p$  naměřené v prostředí BR pufru o pH 2,0 byly nejvyšší, ale po vložení regeneračních potenciálů 0 a 1700 mV, jež byly vyhodnoceny jako vhodné pro udržení dlouhodobě dobré opakovatelnosti (bez použití regeneračního kroku před každým měřením soustavně klesala hodnota  $I_p$  s počtem měření), na pracovní elektrodu se signál sice zvýšil, ale vlna se deformovala a byla hůře vyhodnotitelná. Tato skutečnost je znázorněna na obr. 4.3. Pro následující měření koncentračních závislostí technikou DCV na BDDFE bylo zvoleno jako optimální prostředí BR pufr o pH 3,0, kde byla vlna také dobře vyvinutá a vkládanými regeneračními potenciály se tolik nedeformovala.



**Obr. 4.3** Voltamogramy 5-NI ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřené technikou DCV na BDDFE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = 1700 \text{ mV}$ ) v prostředí BR pufru o pH 2,0 (1); 3,0 (2).

#### 4.1.2 Vliv regeneračních potenciálů

Experimentálně byly hledány optimální regenerační potenciály  $E_{\text{reg},1}$  a  $E_{\text{reg},2}$  vkládané na BDDFE. Bylo provedeno vždy 20 stanovení 5-NI o  $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí BR pufru o pH 3 s různými hodnotami regeneračních potenciálů. Křivky byly vyhodnoceny a byla vypočtena relativní směrodatná odchylka ( $s_r$ ) pro každou dvojici regeneračních potenciálů. Výsledky jsou shrnuty v tab. 4.2.

**Tab. 4.2**

Relativní směrodatné odchylky pro různé dvojice vkládaných regeneračních potenciálů  $E_{\text{reg},1}$  a  $E_{\text{reg},2}$  na BDDFE. Měřeno technikou DCV v prostředí BR pufru o pH 3. Počet měření  $n = 20$ .  $c(5\text{-NI}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

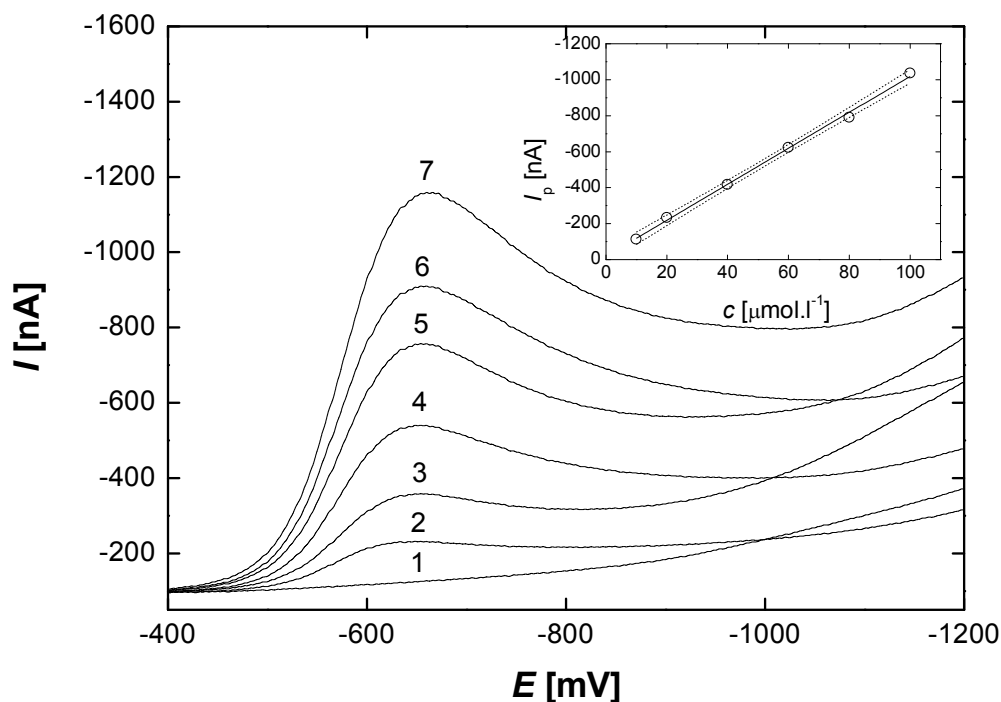
$E_{\text{reg},1} [\text{mV}]$	$E_{\text{reg},2} [\text{mV}]$	$s_r [\%]$
– a	– a	7,1
–1400	1700	0,6
0	1700	0,2
–1400	0	2,2

a – bez regenerace

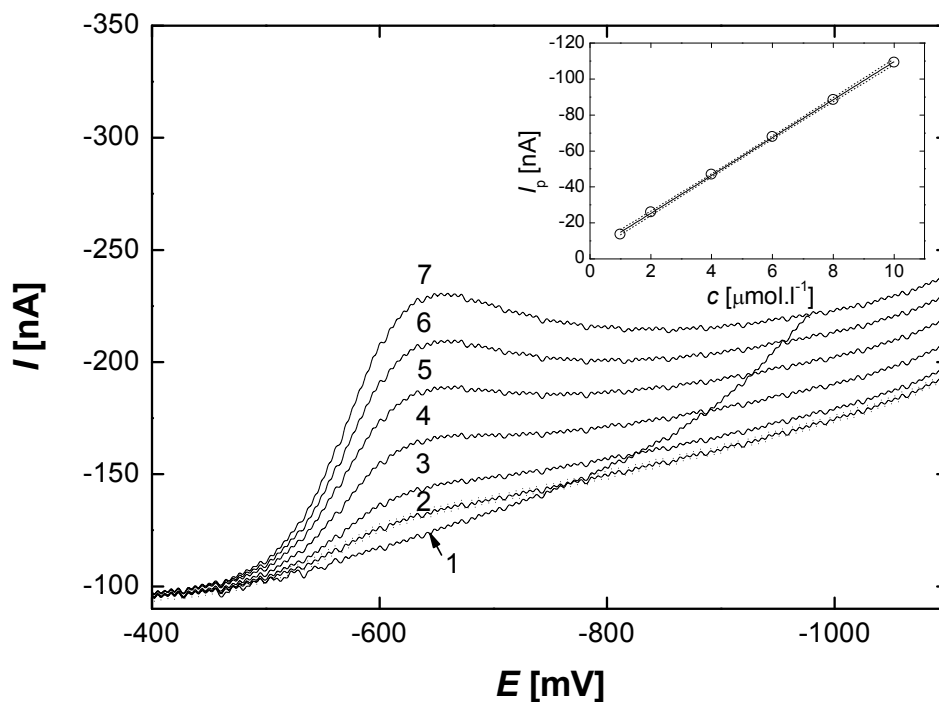
Na základě výše uvedených výsledků byly vybrány optimální podmínky pro stanovení 5-NI technikou DCV na BDDFE: prostředí BR pufru o pH 3,0 a vkládané regenerační potenciály 0 a 1700 mV.

#### 4.1.3 Koncentrační závislosti

Technikou DCV na BDDFE byly proměřeny závislosti proudu píků  $I_p$  na koncentraci 5-NI. Měřeno bylo v prostředí BR pufru o pH 3,0 a na pracovní elektrodu byly vkládány regenerační potenciály o hodnotě  $E_{\text{reg},1} = 0$  mV,  $E_{\text{reg},2} = 1700$  mV. Naměřené koncentrační závislosti v rozmezí  $(1-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  jsou uvedeny níže na obr. 4.4 a obr. 4.5.



**Obr. 4.4** Voltamogramy 5-NI naměřené technikou DCV na BDDFE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0$  V,  $E_{\text{reg},2} = 1700$  mV) v prostředí BR pufru o pH 3,0, v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .  $c(5\text{-NI})$ : 0 (1);  $1 \cdot 10^{-5}$  (2);  $2 \cdot 10^{-5}$  (3);  $4 \cdot 10^{-5}$  (4);  $6 \cdot 10^{-5}$  (5);  $8 \cdot 10^{-5}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-5}$  (7)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vložena závislost proudu píků  $I_p$  5-NI na koncentraci 5-NI. Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .



**Obr. 4.5** Voltamogramy 5-NI naměřené technikou DCV na BDDFE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = 1700 \text{ mV}$ ) v prostředí BR pufru o pH 3,0, v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .  $c(5\text{-NI})$ : 0 (1);  $1 \cdot 10^{-6}$  (2);  $2 \cdot 10^{-6}$  (3);  $4 \cdot 10^{-6}$  (4);  $6 \cdot 10^{-6}$  (5);  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-6}$  (7)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vložena závislost proudu píků  $I_p$  5-NI na koncentraci 5-NI. Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Naměřené koncentrační závislosti vykazovaly lineární charakter v celém proměřeném koncentračním rozmezí. Parametry těchto závislostí jsou uvedeny v tab. 4.3.

**Tab. 4.3**

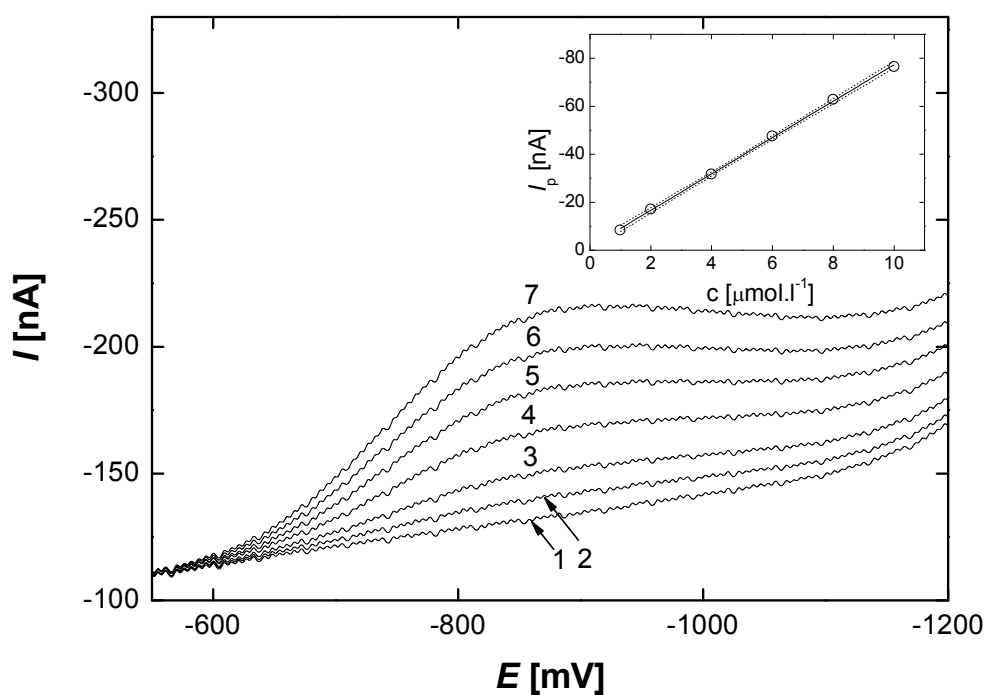
Parametry kalibračních křivek pro stanovení 5-NI technikou DCV na BDDFE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = 1700 \text{ mV}$ ) v prostředí BR pufru o pH 3,0.

Koncentrace [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]	Směrnice [ $\text{mA} \cdot \text{l} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	$L_Q$ [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]
$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-10,00 \pm 0,24$	$-18,70 \pm 14,37$	-0,9988	—
$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$-10,53 \pm 0,10$	$-4,26 \pm 0,61$	-0,9998	$6,0 \cdot 10^{-7}$

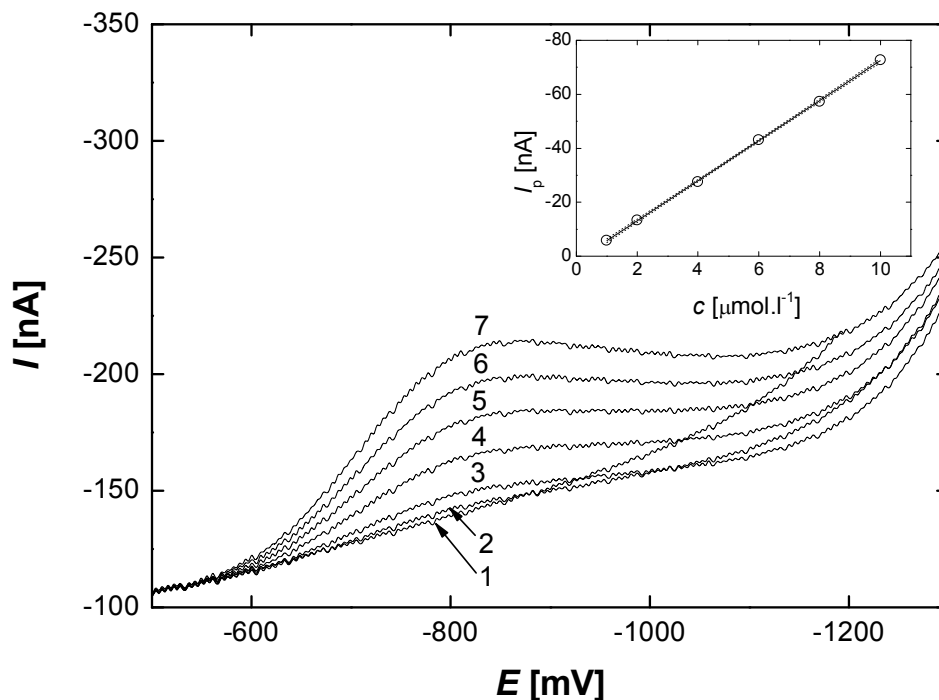
#### 4.1.4 Stanovení 5-NI v modelových vzorcích pitné a říční vody

Dále byly naměřeny kalibrační závislosti 5-NI metodou DCV na BDDFE v pitné i říční vodě v rozmezí koncentrací  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Pro tato stanovení byly použity dříve zjištěné optimální podmínky (BR pufr o pH 3,0 a regenerační potenciály  $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = 1700 \text{ mV}$ ). Roztoky byly připraveny odpipetováním 9,0 modelového vzorku vody s příslušným přídavkem 5-NI do 10ml odměrné baňky a doplněna vodou BR pufr o pH 3,0.

Níže jsou zobrazeny kalibrační závislosti 5-NI při koncentračním rozmezí  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v pitné (obr. 4.6 ) a říční (obr. 4.7 ) vodě. Parametry koncentračních závislostí jsou shrnuty v tab. 4.4.



**Obr. 4.6** Voltamogramy 5-NI naměřené metodou DCV na BDDFE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = 1700 \text{ mV}$ ) v modelovém vzorku (pitná voda – BR pufr o pH 3,0 (9:1)) v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .  $c(5\text{-NI})$ : 0 (1);  $1 \cdot 10^{-6}$  (2);  $2 \cdot 10^{-6}$  (3);  $4 \cdot 10^{-6}$  (4);  $6 \cdot 10^{-6}$  (5);  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-6}$  (7)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vložena závislost proudu píků  $I_p$  5-NI na koncentraci 5-NI. Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .



**Obr. 4.7** Voltamogramy 5-NI naměřené metodou DCV na BDDFE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = 1700 \text{ mV}$ ) v modelovém vzorku (říční voda – BR pufru o pH 3,0 (9:1)) v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .  $c(5\text{-NI})$ : 0 (1);  $1 \cdot 10^{-6}$  (2);  $2 \cdot 10^{-6}$  (3);  $4 \cdot 10^{-6}$  (4);  $6 \cdot 10^{-6}$  (5);  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-6}$  (7)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vložena závislost proudu píků  $I_p$  5-NI na koncentraci 5-NI. Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

**Tab. 4.4**

Parametry kalibračních křivek pro stanovení 5-NI metodou DCV na BDDFE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = 1700 \text{ mV}$ ) v modelových vzorcích pitné a říční vody.

voda	Koncentrace [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]	Směrnice [ $\text{mA} \cdot \text{l} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	$L_Q$ [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]
pitná	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-7,50 \pm 0,53$	$-120,2 \pm 32,0$	-0,9903	—
	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$-7,58 \pm 0,91$	$-1,48 \pm 0,55$	-0,9997	$2,0 \cdot 10^{-6}$
říční	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-6,85 \pm 0,17$	$-45,8 \pm 10,5$	-0,9987	—
	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$-7,42 \pm 0,05$	$1,72 \pm 0,29$	-0,9998	$9,0 \cdot 10^{-7}$

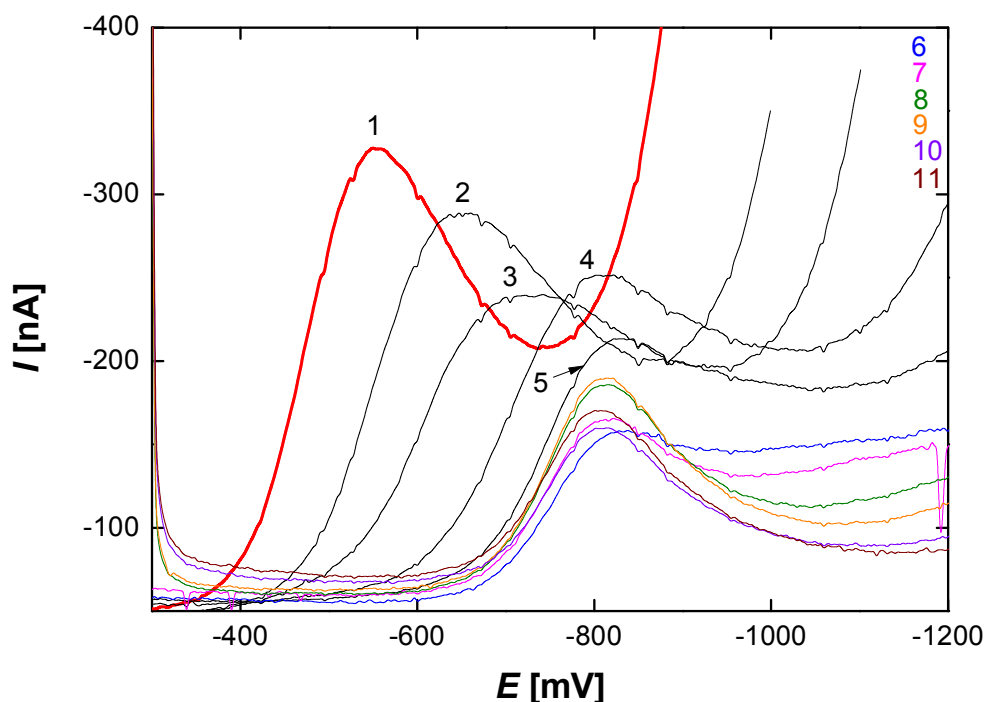
## 4.2 Diferenční pulzní voltametrie 5-nitroimidazolu

### 4.2.1 Vliv pH

Elektrochemické chování 5-NI bylo studováno také technikou DPV na BDDFE v prostředí BR pufru o pH v rozmezí 2,0 až 12,0. Látka opět poskytuje jeden pík v celé oblasti pH. Potenciálové okno se v oblasti kyselých pH s vyšší hodnotou pH posouvá k negativnějším potenciálům. V zásaditém prostředí se hodnota potenciálu  $E_p$  téměř nemění. Získané voltamogramy 5-NI ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) pro různé hodnoty pH jsou zobrazeny na obr. 4.8. Naměřené hodnoty  $I_p$  5-NI a  $E_p$  5-NI v závislosti na pH jsou uvedeny v tab. 4.5. Grafická závislost  $E_p$  5-NI na pH je zobrazena na obr. 4.9. Metodou lineární regrese byl pro závislost potenciálu píku  $E_p$  5-NI na pH roztoku v rozmezí hodnot 2,0 až 5,0 vypočten vztah (6) a pro rozmezí hodnot 6,0 až 12,0 vztah (7)

$$E_p [\text{mV}] = -81,5 \cdot \text{pH} - 396,0 \quad (R = -0,9991) \quad (6)$$

$$E_p [\text{mV}] = 3,3 \cdot \text{pH} - 848,5 \quad (R = -0,9067) \quad (7)$$

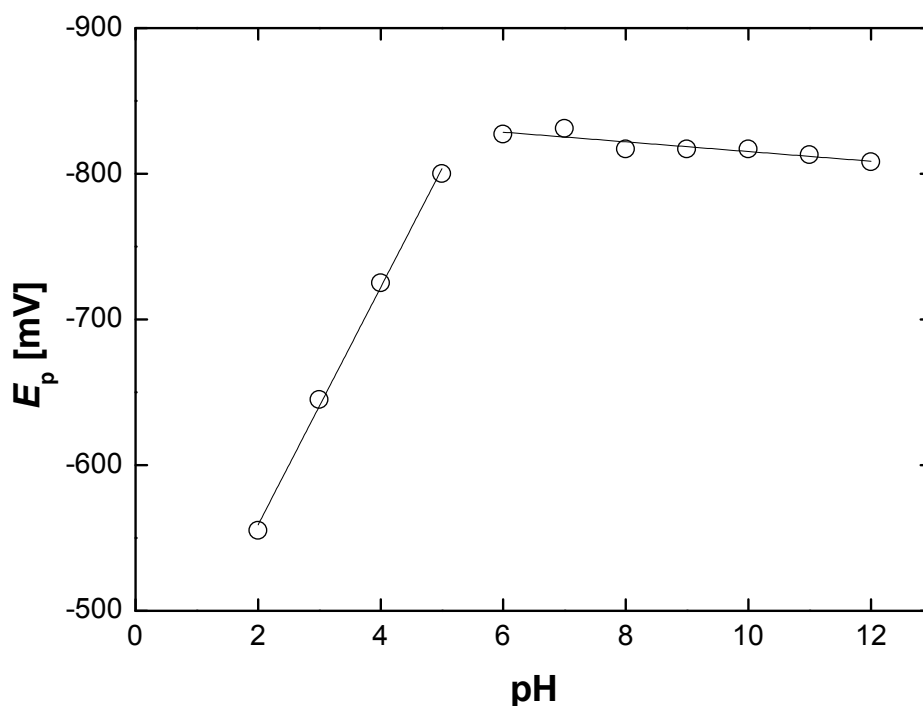


**Obr. 4.8** Voltamogramy 5-NI ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřené technikou DPV na BDDFE bez regenerace v prostředí BR pufru o pH 2,0 (1); 3,0 (2); 4,0 (3); 5,0 (4); 6,0 (5); 7,0 (6); 8,0 (7); 9,0 (8); 10,0 (9); 11,0 (10) a 12,0 (11). Zvolené optimální prostředí reprezentuje červená křivka.

**Tab. 4.5**

Závislost proudu píku  $I_p$  a potenciálu píku  $E_p$  5-NI na pH měřená technikou DPV na BDDFE bez regenerace v prostředí BR pufru. Experimentální podmínky shodné jako u obr. 4.8.

pH	$I_p$ [nA]	$E_p$ [mV]
2,0	-272,2	-555
3,0	-237,6	-645
4,0	-172,7	-725
5,0	-193,4	-800
6,0	-146,4	-827
7,0	-112,0	-831
8,0	-105,1	-817
9,0	-122,8	-817
10,0	-123,4	-817
11,0	-91,8	-813
12,0	-98,9	-808



**Obr. 4.9** Závislost potenciálu píku  $E_p$  5-NI na pH měřená technikou DCV na BDDFE bez regenerace v prostředí BR pufru. Experimentální podmínky shodné jako u obr. 4.8.



Naměřené píky 5-NI v prostředí BR pufru o pH 2,0 byly nejvyšší i dobře vyhodnotitelné. Pro další měření technikou DPV na BDDFE bylo tedy zvoleno jako optimální prostředí BR pufr o pH 2,0.

#### 4.2.2 Vliv regeneračních potenciálů

Vliv regeneračních potenciálů  $E_{\text{reg},1}$  a  $E_{\text{reg},2}$  na stanovení 5-NI technikou DPV na BDDFE byl zjišťován stejným způsobem jako pro techniku DCV. Po vyhodnocení naměřených křivek byly opět zjištěny relativní směrodatné odchylky pro různé dvojice regeneračních potenciálů. Výsledky jsou uvedeny v tabulce tab. 4.6.

**Tab. 4.6**

Relativní směrodatné odchylky pro různé dvojice vkládaných regeneračních potenciálů  $E_{\text{reg},1}$  a  $E_{\text{reg},2}$  na BDDFE. Měřeno technikou DPV v prostředí BR pufru o pH 2. Počet měření  $n = 20$ .  $c(5\text{-NI}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

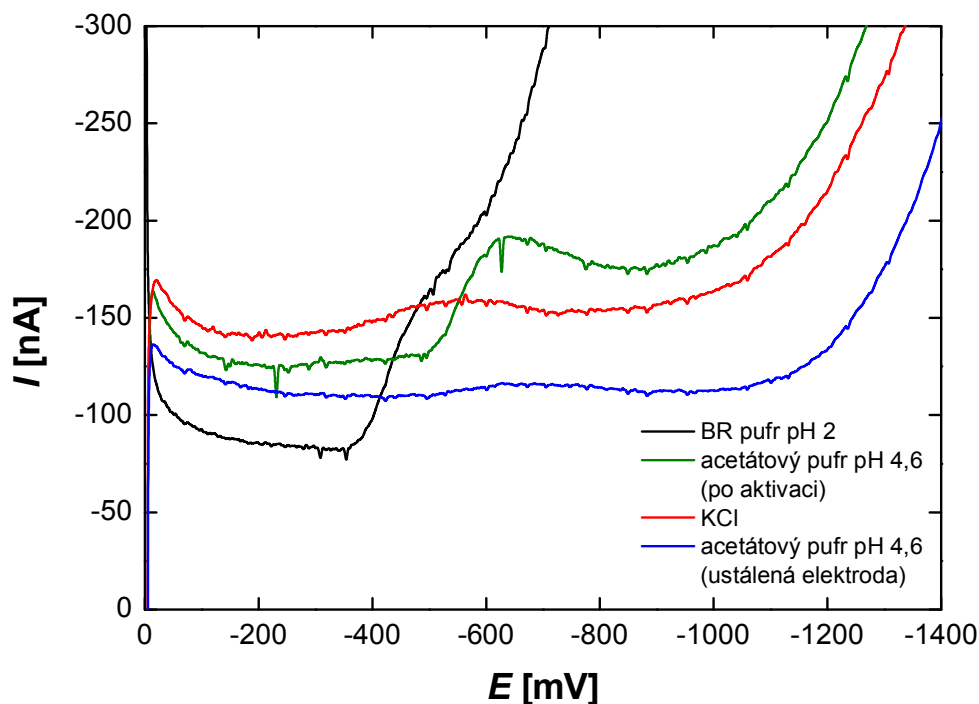
$E_{\text{reg},1} [\text{mV}]$	$E_{\text{reg},2} [\text{mV}]$	$s_r [\%]$
– <sup>a</sup>	– <sup>a</sup>	32,5
–1000	1700	5,4
0	1700	0,8
–1000	0	10,3

a – bez regenerace

Vybrané optimální podmínky pro naměření koncentračních závislostí 5-NI technikou DPV na BDDFE byly následující: regenerační potenciály vkládané na pracovní elektrodu ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = 1700 \text{ mV}$ ) a prostředí BR pufru o pH 2,0. Po aktivaci elektrody se v ZE začal objevovat pík, který byl pravděpodobně způsoben elektrochemicky katalyzovanou předredukcí vodíkových iontů, v důsledku přítomnosti jistého malého množství méně kvalitních diamantových krystalků na povrchu elektrody [69]. Pokud se aktivace nepovedla, pík v ZE se částečně zmenšil, ale výrazně poklesla citlivost stanovení. Z tohoto důvodu bylo hledáno alternativní prostředí, ve kterém by po aktivaci předredukční pík nebyl tak významný a citlivost metody stále dobrá.

Mezi testovanými variantami byl  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  acetátový pufr o pH 4,6, a  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  roztok KCl. Z těchto možností bylo nakonec vybráno prostředí acetátového pufru, jelikož následující měření vykazovalo dobrou opakovatelnost, narozdíl od měření v roztoku KCl, a

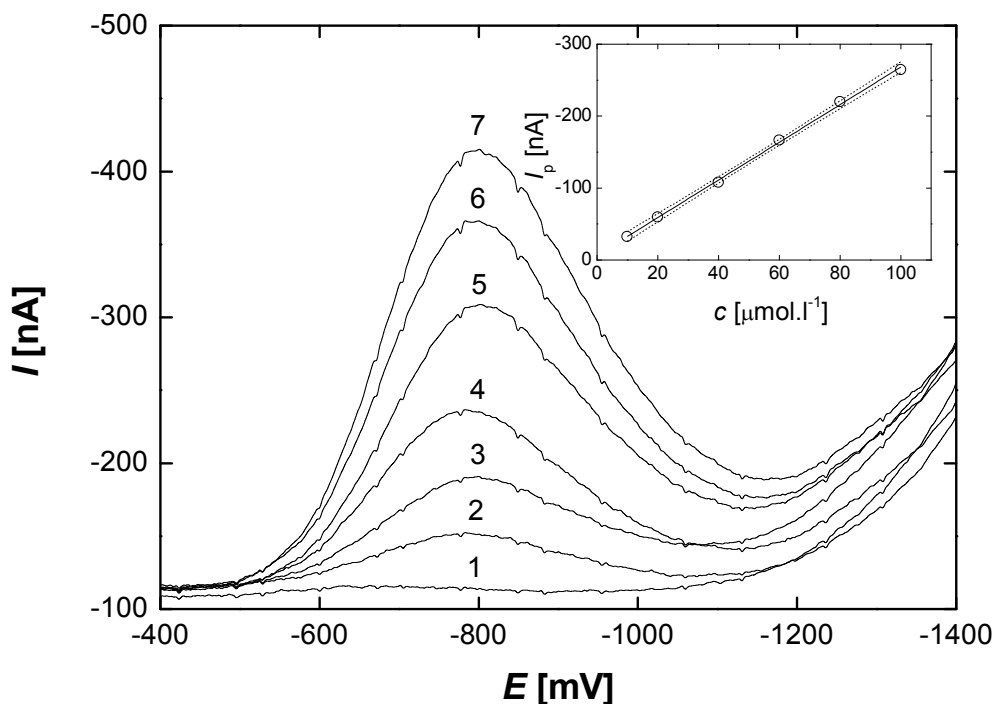
oproti BR pufru o pH 2,0 měl tu výhodu, že v něm předredukční pík s časem a s ustálením elektrody zčásti zmizel (obr. 4.10).



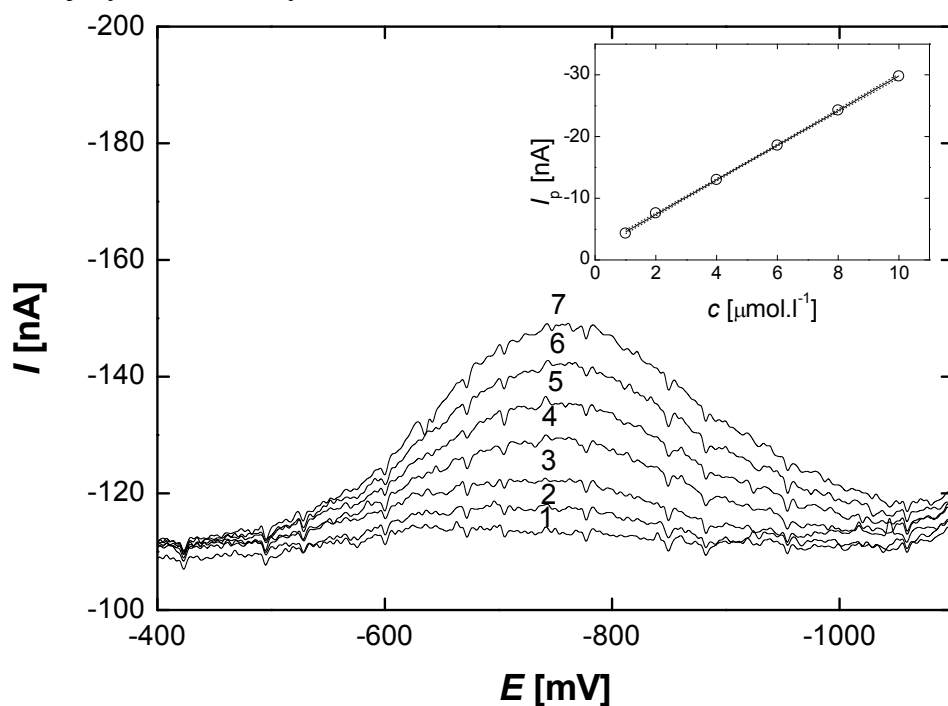
**Obr. 4.10** Voltamogramy 5-NI ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřené technikou DPV na BDDFE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = 1700 \text{ mV}$ ) v prostředí acetátového pufru o pH 4,6, roztoku KCl a BR pufru o pH 2.

### 4.2.3 Koncentrační závislosti

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem byly koncentrační závislosti 5-NI technikou DPV na BDDFE v rozmezí  $(1-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  naměřeny v prostředí acetátového pufru o pH 4,6. Získané voltamogramy jsou uvedeny na obr. 4.11 a obr. 4.12.



**Obr. 4.11** Voltamogramy 5-NI naměřené technikou DPV na BDDFE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = 1700 \text{ mV}$ ) v prostředí acetátového pufru o pH 4,6 v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .  $c(5\text{-NI})$ : 0 (1);  $1 \cdot 10^{-5}$  (2);  $2 \cdot 10^{-5}$  (3);  $4 \cdot 10^{-5}$  (4);  $6 \cdot 10^{-5}$  (5);  $8 \cdot 10^{-5}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-5}$  (7)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vložena závislost proudu píků  $I_p$  5-NI na koncentraci 5-NI. Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .



**Obr. 4.12** Voltamogramy 5-NI naměřené technikou DPV na BDDFE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = 1700 \text{ mV}$ ) v prostředí acetátového pufru o pH 4,6 v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .  $c(5\text{-NI})$ : 0 (1);  $1 \cdot 10^{-6}$  (2);  $2 \cdot 10^{-6}$  (3);  $4 \cdot 10^{-6}$  (4);  $6 \cdot 10^{-6}$  (5);  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-6}$  (7)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vložena závislost proudu píků  $I_p$  5-NI na koncentraci 5-NI. Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Koncentrační závislosti 5-NI proměřené v prostředí acetátového pufru byly lineární přes oba koncentrační řády. Parametry těchto závislostí jsou uvedeny v tab. 4.7.

**Tab. 4.7**

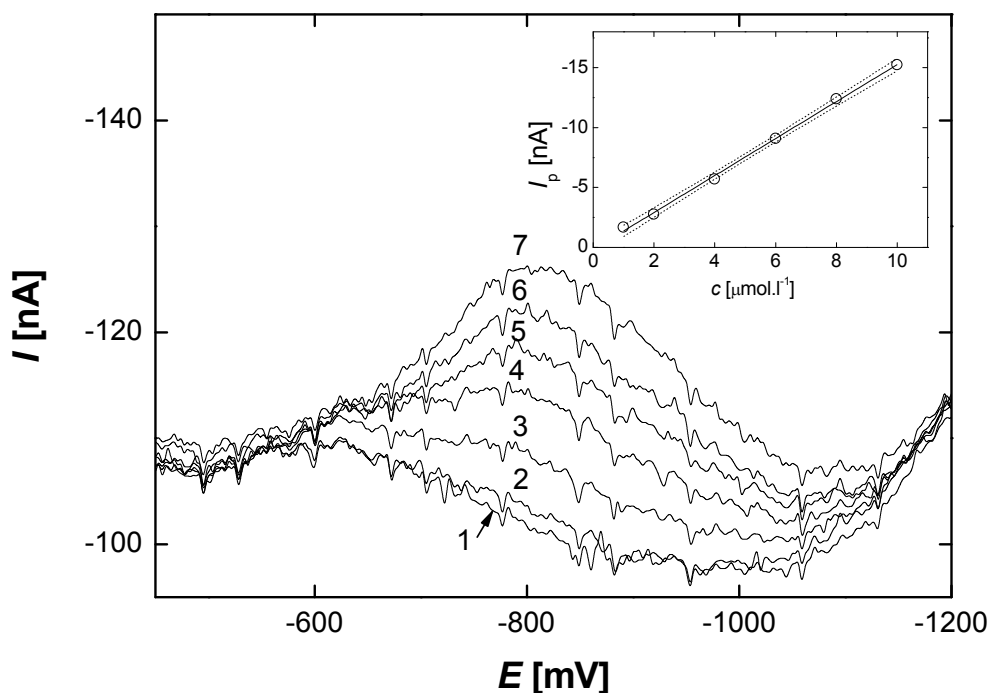
Parametry kalibračních křivek pro stanovení 5-NI technikou DPV na BDDFE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = 1700 \text{ mV}$ ) v prostředí acetátového pufru o pH 4,6.

Koncentrace [mol·l <sup>-1</sup> ]	Směrnice [mA·l·mol <sup>-1</sup> ]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	$L_Q$ [mol·l <sup>-1</sup> ]
$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-2,62 \pm 0,05$	$-6,63 \pm 2,80$	-0,9994	—
$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$-2,81 \pm 0,02$	$-1,75 \pm 0,13$	-0,9999	$1,0 \cdot 10^{-6}$

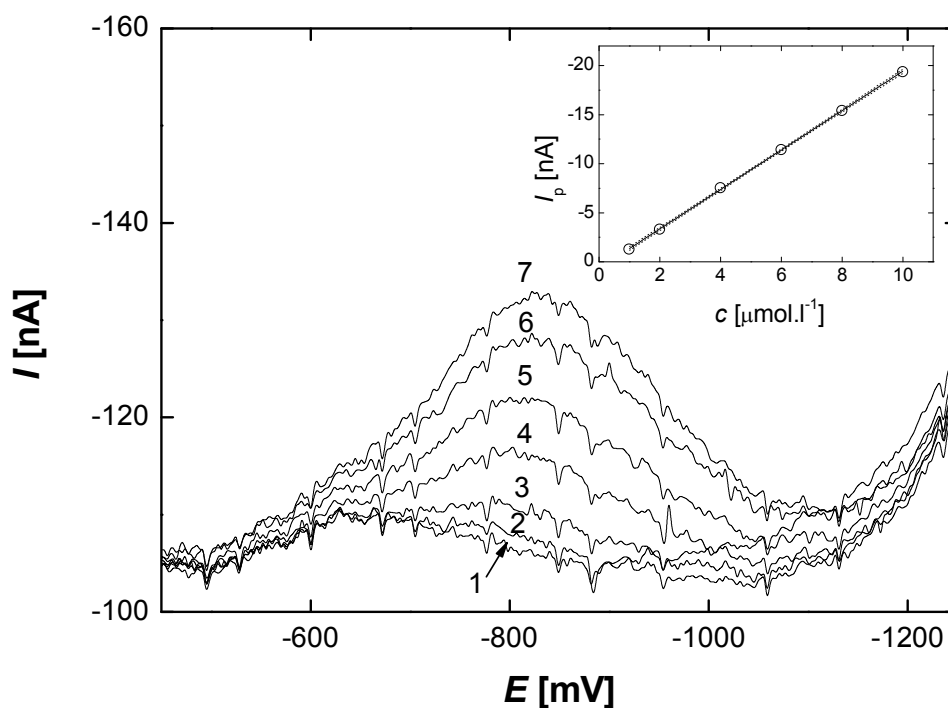
#### 4.2.4 Stanovení 5-NI v modelových vzorcích pitné a říční vody

Nově vyvinutá metoda byla aplikována na stanovení 5-NI v modelových vzorcích pitné a říční vody. Byly proměřeny kalibrační závislosti 5-NI pomocí metody DPV na BDDFE v pitné i říční vodě v rozmezí koncentrací  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Roztoky byly připraveny odpipetováním vždy 9,0 ml modelového vzorku vody (voda s příslušným přídatkem 5-NI) a do 10 ml doplněny acetátovým pufrům. (Faktor ředění odpovídá hodnotě 0,9).

Na obr. 4.13 jsou zobrazeny voltamogramy 5-NI v prostředí pitné vody v koncentračním rozmezí  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Na obr. 4.14 jsou zaznamenány voltamogramy 5-NI pro stejné koncentrační rozmezí v prostředí vody říční. Parametry koncentračních závislostí jsou uvedeny v tab. 4.8.



**Obr. 4.13** Voltamogramy 5-NI naměřené metodou DPV na BDDFE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = 1700 \text{ mV}$ ) v modelovém vzorku (pitná voda – acetátový pufr o pH 4,6 (9:1)) v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .  $c(5\text{-NI})$ : 0 (1);  $1 \cdot 10^{-6}$  (2);  $2 \cdot 10^{-6}$  (3);  $4 \cdot 10^{-6}$  (4);  $6 \cdot 10^{-6}$  (5);  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-6}$  (7)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vloženy závislosti proudu píků  $I_p$  5-NI na koncentraci 5-NI. Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .



**Obr. 4.14** Voltamogramy 5-NI naměřené metodou DPV na BDDFE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = 1700 \text{ mV}$ ) v modelovém vzorku (říční voda – acetátový pufr o pH 4,6 (9:1)) v rozmezí koncentrací  $(1-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .  $c(5\text{-NI})$ :  $0$  (1);  $1 \cdot 10^{-6}$  (2);  $2 \cdot 10^{-6}$  (3);  $4 \cdot 10^{-6}$  (4);  $6 \cdot 10^{-6}$  (5);  $8 \cdot 10^{-6}$  (6) a  $10 \cdot 10^{-6}$  (7)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vloženy závislosti proudu píků  $I_p$  5-NI na koncentraci 5-NI. Konfidenční pásy sestrojeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

**Tab. 4.8**

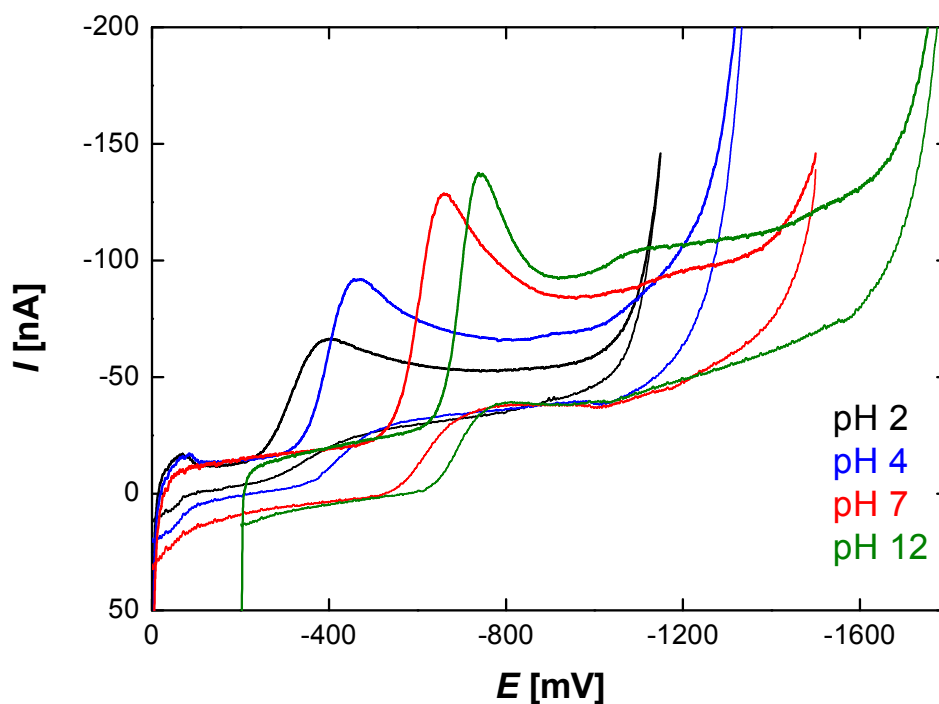
Parametry kalibračních křivek pro stanovení 5-NI metodou DPV na BDDFE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{reg},2} = 1700 \text{ mV}$ ) v modelových vzorcích pitné a říční vody.

voda	Koncentrace [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]	Směrnice [ $\text{mA} \cdot \text{l} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	$L_Q$ [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]
pitná	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-2,11 \pm 0,06$	$12,21 \pm 3,39$	$-0,9986$	—
	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$-1,54 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,20$	$-0,9991$	$1,6 \cdot 10^{-6}$
říční	$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-2,21 \pm 0,03$	$4,88 \pm 1,72$	$-0,9997$	—
	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$-2,01 \pm 0,01$	$0,66 \pm 0,08$	$-0,9999$	$7,0 \cdot 10^{-7}$

## 5. CYKLICKÁ VOLTAMETRIE 5-NI

### 5.1. Cyklická voltametrie 5-NI na m-AgSAE

Elektrochemické chování 5-NI bylo sledováno pomocí cyklické voltametrie v prostředích BR pufru o pH 2, 4, 7 a 12 na m-AgSAE. Měření bylo prováděno při různých rychlostech polarizace ( $v = 10$  až  $500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a cyklické voltamogramy byly zaznamenávány od pozitivnějšího potenciálu k negativnějšímu a zpět. Koncentrace 5-NI byla  $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a na pracovní elektrodu byly před každým měřením vkládány regenerační potenciály  $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -800 \text{ mV}$ . Naměřené cyklické voltamogramy při rychlosti polarizace  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  jsou zobrazeny na obr. 5.1.



**Obr. 5.1** Cyklické voltamogramy 5-NI ( $c = 1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) měřené na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -800 \text{ mV}$ ) v prostředích BR pufru o pH 2,0; 4,0; 7,0 a 12,0. Rychlost polarizace  $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Cyklické voltamogramy v kyselém a neutrálním prostředí poskytují odezvu v podobě jednoho katodického píku. Při zpětném skenu nebyl pozorován žádný anodický pík, jenž by odpovídal reverzibilní či kvazireverzibilní oxidaci analytu nebo jeho redukčních produktů. Tento katodický pík tedy odpovídá ireverzibilní redukcí nitroskupiny na hydroxylamin dle rovnice (8) [19].

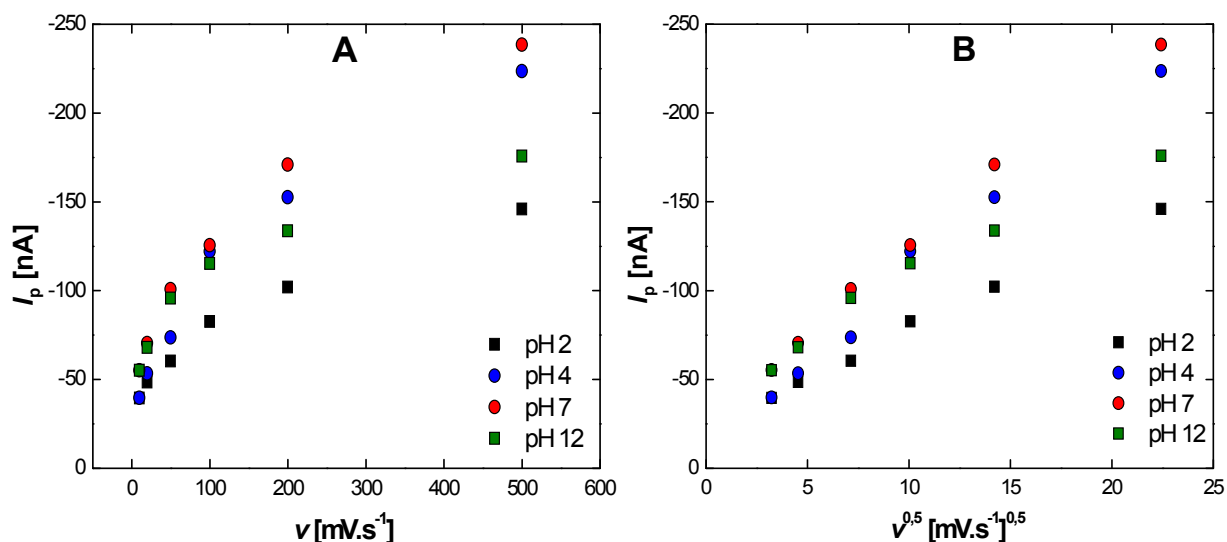


V zásaditém prostředí lze pozorovat dva katodické píky. Redukce 5-NI zde probíhá ve dvou krocích. Nejprve přijmutím jednoho elektronu z povrchu elektrody dochází k částečné redukcí nitroskupiny za vzniku nitro radikál aniontu, poté se radikál anion redukuje na hydroxylamin. Mechanismus probíhá dle rovnic (9, 10) [19].



Naměřené cyklické voltamogramy byly vyhodnoceny a do grafu byla vynesena závislost proudu píku  $I_p$  na rychlosti polarizace  $v$  (Obr. 5.2 A) a na druhé odmocnině z rychlosti polarizace  $v^{0,5}$  (Obr. 5.2 B). Pro vybrané rozsahy rychlostí polarizace je závislost výšky píku na druhé odmocnině z rychlosti polarizace lineární. Lze tedy předpokládat, že redukční děje probíhající na elektrodě jsou řízeny převážně difúzí. Parametry lineárních závislostí jsou uvedeny v tab. 5.1. Na základě hodnot směrnic vnesených závislostí  $\log I_p$  na  $\log v$ , které nabývají hodnot nižších než je teoretická hodnota pro děj zcela řízený difúzí (hodnota 0,5), lze usuzovat, že elektrochemický děj na povrchu elektrody je z části řízen přenosem hmoty a z části kinetikou přenosu náboje [70].

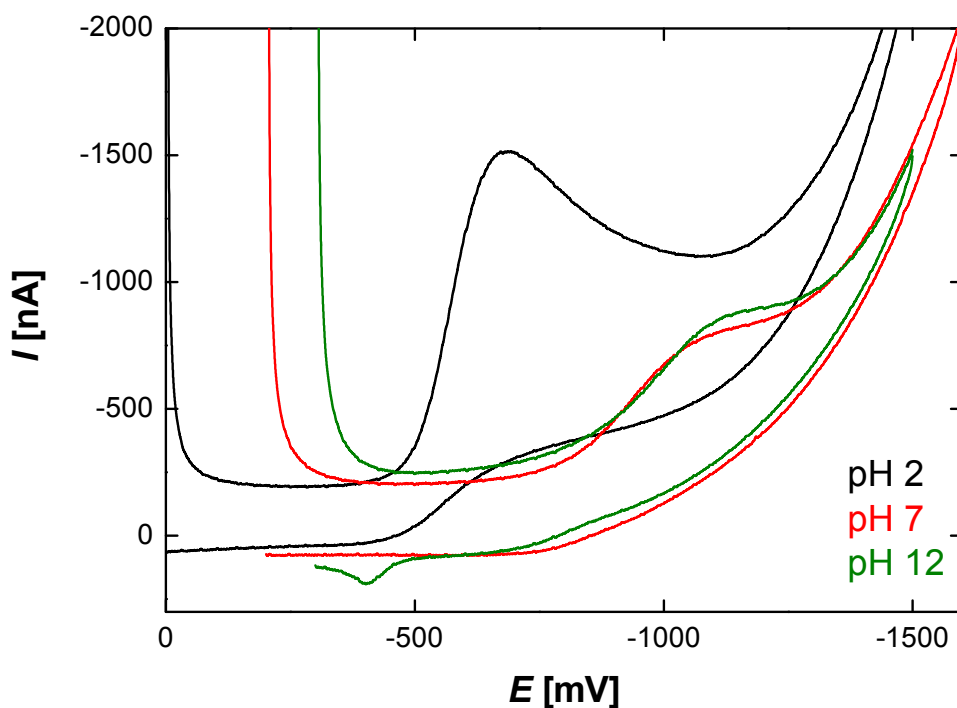




**Obr. 5.2** Závislost výšky katodického píku 5-NI ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na rychlosti polarizace (A), na druhé odmocnině z rychlosti polarizace (B). Hodnoty naměřené technikou CV na m-AgSAE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = -800 \text{ mV}$ ) v prostředí BR pufru o pH 2,0; 4,0; 7,0 a 12,0.

### 5.1. Cyklická voltametrie 5-NI na BDDFE

Redukční mechanismus 5-NI byl taktéž sledován pomocí cyklické voltametrie na BDDFE. Měřeno bylo v prostředích BR pufru o pH 3, 7 a 12 při různých rychlostech polarizace ( $v = 10$  až  $500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a cyklické voltamogramy byly zaznamenávány od pozitivnějšího potenciálu k negativnějšímu a nazpět. Koncentrace 5-NI zde byla  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Na pracovní elektrodu byly vkládány regenerace  $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = 1700 \text{ mV}$ . Cyklické voltamogramy naměřené při rychlosti polarizace  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  jsou zobrazeny na obr. 5.3.

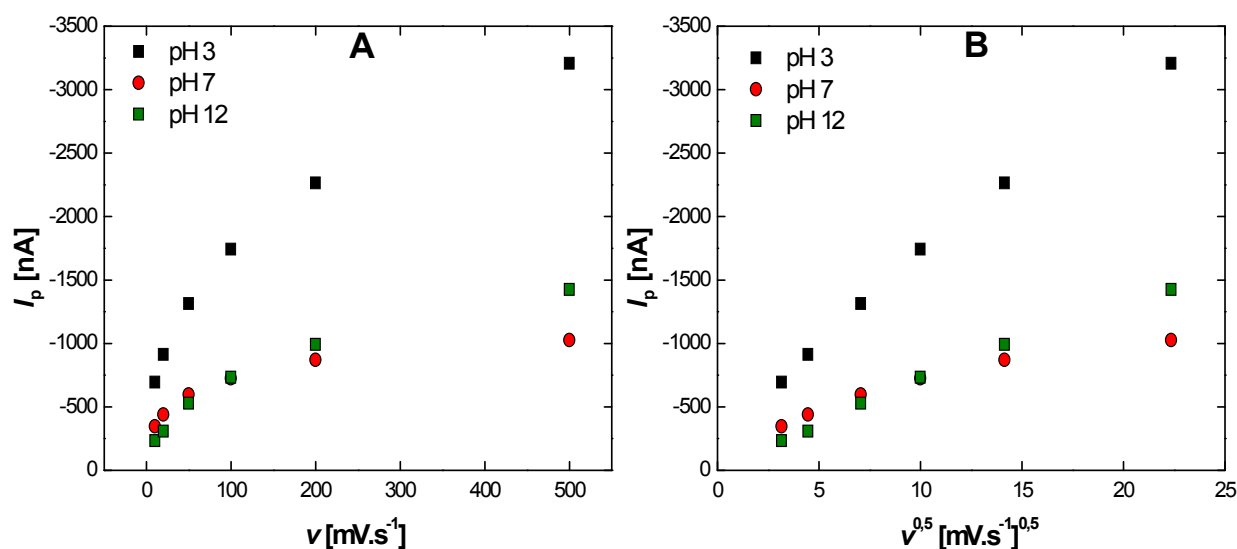


**Obr. 5.3** Cyklické voltamogramy 5-NI ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) měřené na BDDFE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = 1700 \text{ mV}$ ) v prostředí BR pufru o pH 3,0; 7,0 a 12,0. Rychlost polarizace  $\nu = 50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ .

V kyselém a neutrálním pH prostředí 5-NI poskytoval jeden katodický pík. Při zpětném skenu nebyl zaznamenán žádný anodický pík, z této skutečnosti lze usoudit, že se jednalo o ireverzibilní děj, opět probíhající dle rovnice (6).

Při měření CV 5-NI v zásaditém prostředí byl ve zpětném skenu dobře viditelný anodický pík. Pravděpodobně se jednalo o reverzibilní dvouelektronovou oxidaci hydroxylaminu na nitroso skupinu, čemuž by odpovídal i pozorovaný reverzibilní protipík zaznamenaný ve druhém dopředném skenu (na obr. 5.3 není zobrazen).

Cyklické voltamogramy na BDDFE byly vyhodnoceny pro pH 3 a 12 v celém rozsahu rychlostí polarizace, pro pH 7 pouze v intervalu 10 až  $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . Závislost proudu katodického píku  $I_p$  na rychlosti polarizace  $\nu$  je uvedena na obr. 5.4 A a závislost píku  $I_p$  na druhé odmocnině z rychlosti polarizace  $\nu^{0,5}$  na obr. 5.4 B. Z grafů je vidno, že pro všechna prostředí o daném pH je pro zohledněný rozsah rychlostí polarizace závislost výšky píku na druhé odmocnině z rychlosti polarizace lineární. Můžeme předpokládat, že redukční děje, které se uskutečňují na povrchu elektrody, jsou řízeny čistě difúzí pouze v silně zásaditých prostředích (hodnota směrnice závislosti  $\log I_p$  na  $\log \nu$  blízká hodnotě 0,5), v prostředích kyselých a neutrálních a slabě zásaditých přispívá k výsledné rychlosti elektrochemické redukce také její reakční kinetika. Parametry lineárních závislostí jsou shrnuty v tab. 5.1.



**Obr. 5.4** Závislost výšky katodického píku 5-NI ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ ) na rychlosti polarizace (A), na druhé odmocnině z rychlosti polarizace (B). Hodnoty naměřené technikou CV na BDDFE s regenerací ( $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ V}$ ,  $E_{\text{reg},2} = 1700 \text{ mV}$ ) v prostředích BR pufru o pH 3,0; 7,0 a 12,0.

**Tab. 5.1** Parametry lineární závislosti výšky katodického píku 5-NI ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \Gamma^{-1}$ ) na druhé odmocnině z rychlosti polarizace. Měřeno technikou CV na m-AgSAE a na BDDFE v prostředí BR pufru o daném pH.

Pracovní elektroda	pH BR pufru	$v$ [ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ]	Směrnice [ $\text{nA} \cdot \text{mV}^{-0,5} \cdot \text{s}^{0,5}$ ]	Úsek [ $\text{nA}$ ]	Korelační koeficient	Směrnice $\log I_p$ vs. $\log v$
m-AgSAE	2	10 – 500	$-5,54 \pm 0,15$	$-22,84 \pm 1,83$	$-0,9985$	$0,33 \pm 0,01$
	4	10 – 50	$-8,56 \pm 0,67$	$-12,94 \pm 3,48$	$-0,9970$	$0,38 \pm 0,02$
	7	10 – 500	$-9,55 \pm 0,31$	$-28,72 \pm 3,82$	$-0,9979$	$0,38 \pm 0,01$
	12	10 – 100	$-8,91 \pm 0,70$	$-27,73 \pm 4,74$	$-0,9939$	$0,33 \pm 0,01$
BDDFE	3	10 – 500	$-130,5 \pm 4,7$	$-357,1 \pm 56,8$	$-0,9974$	$0,39 \pm 0,00$
	7	10 – 100	$-34,9 \pm 4,5$	$-310,5 \pm 54,6$	$-0,9683$	$0,33 \pm 0,01$
	12	10 – 500	$-62,7 \pm 2,7$	$-63,5 \pm 33,2$	$-0,9962$	$0,48 \pm 0,02$

## 6. ZÁVĚR

V této diplomové práci byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení 5-nitroimidazolu (5-NI) pomocí technik DC volumetrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě (m-AgSAE). Aplikovatelnost nově vyvinutých metod byla prověřena stanovením 5-NI v modelových vzorcích pitné a říční vody. Dále byly hledány vhodné podmínky pro stanovení 5-NI technikami DCV a DPV na borem dopované diamantové filmové elektrodě (BDDFE). Při zjištěných optimálních podmínkách byly ověřeny metody stanovení 5-NI technikami DCV a DPV na BDDFE v modelových vzorcích pitné a říční vody. Dosažené meze stanovitelnosti pro techniky DCV i DPV na obou elektrodách jsou uvedeny v tab. 6.1.

Byla zkoumána možnost využití techniky AdSDPV na m-AgSAE ke snížení meze stanovitelnosti 5-NI oproti DPV. Míra akumulace však nebyla dostatečná a pro tuto techniku nebyly nalezeny vhodné podmínky.

Pomocí cyklické voltametrie (CV) byl studován redukční mechanismus 5-NI na obou zmiňovaných elektrodách. V kyselém a neutrálním prostředí se nitroskupina redukuje ireverzibilně na hydroxylamin. V zásaditém prostředí se nitroskupina redukuje ireverzibilně ve dvou krocích. Redukční děje probíhající na povrchu elektrody jsou řízeny čistě difuzí pouze v silně zásaditém prostředí na BDDFE.

**Tab. 6.1** Shrnutí dosažených mezí stanovitelnosti 5-NI pro techniky DCV a DPV na obou elektrodách

Metoda	Prostředí	$L_Q$ [mol·l <sup>-1</sup> ]	
DCV na m-AgSAE	BR pufr pH 7,0	Deionizovaná voda	$1,0 \cdot 10^{-6}$
		Pitná voda	$1,4 \cdot 10^{-6}$
		Říční voda	$8,0 \cdot 10^{-7}$
DPV na m-AgSAE	BR pufr pH 10,0	Deionizovaná voda	$1,5 \cdot 10^{-6}$
		Pitná voda	$7,0 \cdot 10^{-7}$
		Říční voda	$1,1 \cdot 10^{-6}$
DCV na BDDFE	BR pufr pH 3,0	Deionizovaná voda	$6,0 \cdot 10^{-7}$
		Pitná voda	$2,0 \cdot 10^{-6}$
		Říční voda	$9,0 \cdot 10^{-7}$
DPV na BDDFE	Acetátový pufr pH 4,6	Deionizovaná voda	$1,0 \cdot 10^{-6}$
		Pitná voda	$1,6 \cdot 10^{-6}$
		Říční voda	$7,0 \cdot 10^{-7}$

## 7. LITERATURA

1. Merck Millipore: <http://www.merckmillipore.com/>, staženo 24.4.2013.
2. Sigma-Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com/>, staženo 24.4.2013.
3. Bhatnagar, A.; Sharma, P. K.; Kumar, N.: A Review on “Imidazoles”: Their Chemistry and Pharmacological Potentials. *International Journal of PharmTech Research* **3**, 268-282 (2011).
4. Maeda, K.; Osato, T; Umezawa, H.: A new antibiotic, azomycin. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)* **6**, 182 (1953).
5. Hofmann, K.: *Imidazole and its Derivatives*. InterScience, New York 1953.
6. Hernández-Mesa, M.; Cruces-Blanco, C.; García-Campaña, A. M.: Determination of 5-nitroimidazoles and metabolites in enviromental samples by micellar electrokinetic chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **404**, 297-305 (2012).
7. Ré, J. L.; De Méo, M. P.; Laget, M.; Guiraud, H.; Castegnaro, M.; Vanelle, P.; Duménil, G.: Evaluation of the genotoxic activity of metronidazole and dimetridazole in human lymphocytes by the comet assay. *Mutation Research* **375**, 147-155 (1997).
8. Rodriguez Ferreiro, G.; Cancino Badias, L.; Lopez-Nigro, M.; Palermo, A.; Mudry, M.; González Elio, P.; Carballo, M. A.: DNA single strand breaks in peripheral blood lymphocytes induced by three nitroimidazole derivatives. *Toxicology Letters* **132**, 109-115 (2002).
9. Goldman, P.: The development of 5-nitroimidazoles for the treatment and prophylaxis of anaerobic bacterial infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **10**, 23-33 (1982).
10. Commission Regulation (EU) No. 37/2010 of 22 December 2009, on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union* (2010).
11. Jiang, X.; Lin, X.: Voltammetry of the interaction of metronidazole with DNA and its analytical applications. *Bioelectrochemistry* **68**, 206-212 (2006).

12. Edwards, D. J.: The action of metronidazole in DNA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **3**, 43-47 (1977).
13. Giorgetti, M.; Tonelli S.; Zanelli, A.; Aquilanti G.; Pellei, M.; Santini, C.: Synchrotron radiation X-ray absorption spectroscopic studies in solution and electrochemistry of a nitroimidazole conjugated heteroscorpionate copper(II) complex. *Polyhedron* **48**, 174-180 (2012).
14. Bollo, S.; Jara-Ulloa, P.; Zapata-Torres, G.: Voltammetric reduction of 4-nitroimidazole derivatives: Influence of the N-1 substitution in protic and aprotic media. *Electrochimica Acta* **55**, 4558-4566 (2010).
15. Upcroft, J. A.; Campbell, R. W.; Benakli, K.; Upcroft, P.; Vanelle, P.: Efficacy of new 5-nitroimidazoles against metronidazole-susceptible and resistant *Giardia*, *Trichomonas* and *Entamoeba* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 73-76 (1999).
16. Winkelmann, E.; Raether, W.; Gebert, U.; Sinharay, A.: Chemotherapeutically active nitro compounds. 4. 5-Nitroimidazoles (Part I). *Arzneimittel-Forschung* **27**, 2251-2263 (1977).
17. Dunn, L. A.; Burgess A. G.; Krauer, K. G.; Eckmann, L.; Vanelle, P.; Crozetc, M. D.; Gillin, F. D.; Upcroft, P.; Upcroft, J. A.: A new-generation 5-nitroimidazole can induce highly metronidazole-resistant *Giardia lamblia* *in vitro*. *International Journal of Antimicrobial Agents* **36**, 37-42 (2010).
18. Ehlhardt, W. J.; Beaulieu, B. B.; Goldman, P.: Nitrosoimidazoles: Highly bactericidal analogues of 5-nitroimidazole drugs. *Journal of Medicinal Chemistry* **31**, 323-329 (1988).
19. Carbajo, J.; Bollo, S.; Núñez-Vergara, L. J.; Campero, A.; Squella, J. A.: Cyclic voltammetric study of the disproportionation reaction of the nitro radical anion from 4-nitroimidazole in protic media. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **531**, 187-194 (2002).
20. Barek, J.; Fischer, J.; Čížek, K.; Pecková, K.: Využití netradičních elektrodových materiálů pro voltametrické stanovení submikromolárních koncentrací vybraných pesticidů. *Chemické listy* **100**, 571-582 (2006).
21. Papoutsis, A.; Kokkinidis, G.: Electrocatalytic reduction of nitro compounds on gold UPD modified electrodes, Part 2. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **371**, 231-239 (1994).

22. Bartlett, P. N.; Ghoneim, E.; El-Hefnawy, G.; El-Hallag, I.: Voltammetry and determination of metronidazole at a carbon fiber microdisk electrode. *Talanta* **66**, 869-874 (2005).
23. 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).
24. Škvorová, L.: *Diploma Thesis*. PřF UK, Praha, 2012.
25. Özkan, S. A.; Senturk, Z.; Biryol, I.: Determination of ornidazole in pharmaceutical dosage forms based on reduction at an activated glassy carbon electrode. *International Journal of Pharmaceutics* **157**, 137-144 (1997).
26. Brett, A. M. O.; Serrano, S. H. P.; Gutz, I. G. R.; La-Scalea, M. A.: Comparison of the voltammetric behavior of metronidazole at a DNA-modified glassy carbon electrode, a mercury thin film electrode and a glassy carbon electrode. *Electroanalysis* **9**, 110-114 (1997).
27. Brooks, M. A.; D'Arconte, L.; De Silva, J. A. F.: Determination of nitroimidazoles in biological fluids by differential pulse polarography. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **65**, 112-114 (1976).
28. Nilsson-Ehle, I. N.; Ursing, B.; Nilsson-Ehle, P.: Liquid chromatographic assay for metronidazole and tinidazole: Pharmacokinetic and metabolic studies in human subjects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **19**, 754-760 (1981).
29. Tendolkar, N. M.; Desai, B. S.; Gaudh, J. S.; Shinde, V. M.: Simultaneous determination of tinidazole and furazolidone in suspension by HPTLC and HPLC. *Analytical Letters* **28**, 1641-1653 (1995).
30. Lanbeck, K.; Lindström, B.: Determination of metronidazole and tinidazole in plasma and feces by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **162**, 117-121 (1979).
31. Zelníčková, H.; Rejtharová, M.: Determination of 5-nitroimidazoles in various types of matrices using molecular imprinted polymer purification. *Food Additives and Contaminants: Part A*, DOI: 10.1080/19440049.2013.780211, (2013).



32. Kanda, M.; Sasamoto, T.; Takeba, K.; Hayashi, H.; Kusano, T.; Matsushima, Y.; Nakajima, T.; Kanai, S.; Takano, I.: Rapid determination of nitroimidazole residues in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International* **95**, 923-931 (2012).
33. Huang, X.; Lin, J.; Yuan, D.: Simple and sensitive determination of nitroimidazole residues in honey using stir bar sorptive extraction with mixed mode monolith followed by liquid chromatography. *Journal of Separation Science* **34**, 2138-2144 (2011).
34. Sun, H-W.; Wang, F-Ch.; Ai, L-F.: Simultaneous determination of seven nitroimidazole residues in meat by using HPLC-UV detection with solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B* **857**, 296-300 (2007).
35. Mitrowska, K.; Posyniak, A.; Zmudzki, J.: Multiresidue method for the determination of nitroimidazoles and their hydroxy-metabolites in poultry muscle, plasma and egg by isotope dilution liquid chromatography-mass spectrometry. *Talanta* **81**, 1273-1280 (2010).
36. Tolgyesi, A.; Sharma, V. K.; Fekete, S.; Fekete, J.; Simon, A.; Farkas, S.: Development of a rapid method for the determination and confirmation of nitroimidazoles in six matrices by fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **64-65**, 40-48 (2012).
37. Solhaug, J. H.; Bergan, T.; Leinebø, O.; Rosseland, A. R.; Spada, L.; Vaagenes, F.: The pharmacokinetics of one single preoperative dose of metronidazole or tinidazole. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **90**, 89-96 (1984).
38. Habel, D.; Guermouche, S.; Guermouche, M. H.: Direct assay of tinidazole in human serum by micellar liquid chromatography. *Biomedical Chromatography* **11**, 16-18 (1997).
39. Guermouche, M. H.; Habel, D.; Guermouche, S.: Assay of tinidazole in human serum by high-performance thin-layer chromatography comparison with high-performance liquid chromatography. *Journal of AOAC International* **82**, 244-247 (1999).
40. Bhatia, S. C.; Shanbhag, V. D.: Electron-capture gas chromatographic assays of 5-nitroimidazole class of antimicrobials in blood. *Journal of Chromatography B* **305**, 325-334 (1984).

41. Lin, Y.; Su, Y.; Liao, X.; Yang, N.; Yang, X.; Choi, M.: Determination of five nitroimidazole residues in artificial porcine muscle tissue samples by capillary electrophoresis. *Talanta* **88**, 646-652 (2012).
42. Proksa, B.; Kooš, M.; Steiner, B.: Separation of derivatives of 1-(2-hydroxypropyl)-2-methyl-5-nitroimidazole by capillary zone electrophoresis. *Chemical Papers* **51**, 276-279 (1997).
43. Darwish, K. M.; Salama, I.; Mostafa, S.; El-Sadek, M.: Extractional spectrophotometric analysis of metronidazole, tinidazole, ornidazole and secnidazole bases through acid-dye complexation using bromothymol blue dye. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* **25**, 207-217 (2012).
44. 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**, 880-886 (2009).
45. Salem, A. A.; Mossa, H. A.; Barsoum, B. N.: Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy for quantitative analysis of miconazole, metronidazole and sulfamethoxazole in pharmaceutical and urine samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**, 654-661 (2006).
46. Rao, K. S.; Banerjee, A.; Keshar, N. K.: Spectrophotometric methods for the simultaneous estimation of ofloxacin and tinidazole in bulk and pharmaceutical dosage form. *Chronicles of Young Scientist* **2**, 98-102 (2011).
47. Yosypchuk, B.; v knize: *Senzory*, kap. 5, 61-66. PACI, Praha (2007).
48. Novotný, L.; Yosypchuk, B.: Pevné stříbrné amalgamové elektrody. *Chemické Listy* **94**, 1118-1120 (2000).
49. Vyskočil, V.; Daňhel, A.; Fischer, J.; Novotný, V.; Deýlová, D.; Musilová-Karaová, J.; Maixnerová, L.; Pecková, K.; Barek, J.: Krása a užitečnost nových elektrodových materiálů. *Chemické Listy* **104**, 1181-1195 (2010).
50. Yosypchuk, B.; Barek J.: Vlastnosti pevných a pastových amalgamových pracovních elektrod odlišné od elektrod z kovové rtuti. *Chemické Listy* **103**, 284-290 (2009).

51. Yosypchuk, B.; Novotný, L.: Nontoxic electrodes of solid amalgam. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **32**, 141-151 (2002).
52. Barek, J.; Fischer, J.; Navrátil, T.; Pecková, K.; Yosypchuk, B.: Silver solid amalgam electrodes as sensors for chemical carcinogens. *Sensors* **6**, 445-452 (2006).
53. Barek, J.; Jandová, K.; Pecková, K.; Zima, J.: Voltammetric determination of aminobiphenyls at a boron-doped nanocrystalline diamond film electrode. *Talanta* **74**, 421-426 (2007).
54. Yosypchuk, O.; Pecková, K.; Barek, J.: Voltametrické stanovení 1-nitropyrenu a 1-aminopyrenu na borem dopované diamantové filmové elektrodě. *Chemické Listy* **104**, 186-190 (2010).
55. Cvačka, J.; Swain, G. M.; Barek, J.; Zima, J.: Stanovení aminonaftalenů a aminobifenylyů kapalinovou chromatografií s amperometrickou detekcí na diamantové filmové elektrodě. *Chemické Listy* **96**, 33-38 (2002).
56. Chen, X. M.; Gao, F. R.; Chen, G. H.: Comparison of Ti/BDD and Ti/SnO<sub>2</sub>-Sb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> electrodes for pollutant oxidation. *Journal of Applied Electrochemistry* **35**, 185-191 (2005).
57. Liang, J.; Gao, Ch.; Zhang, L.; Jiang, L.; Yang, Z.; Wang, Z.; Ji, C.; Le, X.; Rong, C.; Zhang, J.: Studies on distribution of element contents in transient layer at interface between boron-doped diamond film electrode and tantalum substrate. *Applied Surface Science* **257**, 6063-6067 (2011).
58. Faria, E. O.; Lopes Junior, A. C. V.; Souto, D. E. P.; Leite, F. R. F.; Damos, F. S.; Luz, R. D. S.; dos Santos, A. S.; Franco, D. L.; dos Santos, W. T. P.: Simultaneous determination of caffeine and acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond film electrode by differential pulse voltammetry. *Electroanalysis* **24**, 1141-1146 (2012).
59. Lourencao, B. C.; Medeiros, R. A.; Rocha, R. C.; Fatibello, O.: Simultaneous differential pulse voltammetric determination of ascorbic acid and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. *Electroanalysis* **22**, 1717-1723 (2010).
60. Pecková, K.; Barek, J.: Boron doped diamond microelectrodes and microelectrode arrays in organic electrochemistry. *Current Organic Chemistry* **15**, 3014-3028 (2011).

61. Vyskočil, V.; Barek, J.: Electroanalysis of nitro and amino derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Organic Chemistry* **15**, 3059-3076 (2011).
62. Pecková, K.; Jandová, K.; Maixnerová, L.; Swain, G. M.; Barek, J.: Amperometric determination of aminobiphenyls using HPLC-ED with boron-doped diamond electrode. *Electroanalysis* **21**, 316-324 (2009).
63. Kiran, R.; Scorsone, E.; de Sanoit, J.; Arnault, J-Ch.; Mailley, P.; Bergonza, P.: Boron doped diamond electrodes for direct measurement in biological fluids: An *in situ* regeneration approach. *Journal of Electrochemical Society* **160**, H67-H73 (2013).
64. Musilová, J.; Barek, J.; Pecková, K.: Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem pro stanovení organických látek. *Chemické Listy* **103**, 469-478 (2009).
65. Maixnerová, L.; Pecková, K.; Barek, J.; Klímová, H.: Stanovení aminobifenylů v pitné a v říční vodě HPLC s elektrochemickou detekcí pomocí borem dopované diamantové filmové elektrody. *Chemické Listy* **104**, 191-196 (2010).
66. Dejmková, H.; Dag, C.; Barek, J.; Zima, J.: Voltammetric and amperometric determination of metoclopramide on boron-doped diamond film electrode. *Central European Journal of Chemistry* **10**, 1310-1317 (2012).
67. Matthias, O.: *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*, 2. vydání, str. 194. Wiley-VCH, Weinheim (2007).
68. Harvey, D.: *Modern Analytical Chemistry*, str. 96. McGraw-Hill, Toronto (2000).
69. Martin, H. B.; Argoitia, A.; Landau, U.; Anderson, A. B.; Angus, J. C.: Hydrogen and oxygen evolution on boron-doped diamond electrodes. *Journal of Electrochemical Society* **143**, L133-L136 (1996).
70. Wang, J.: *Analytical Electrochemistry*, 3. vydání. Wiley-VCH, Hoboken, NJ (2006).