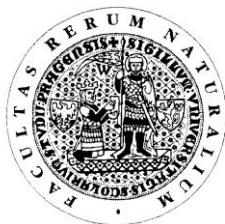


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Diplomová práce

Voltametrické stanovení diazepamu a nordiazepamu
na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě

Voltammetric determination of diazepam and nordiazepam on meniscus
modified silver solid amalgam electrode

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jan Fischer, Ph.D.

Praha 2013

Petr Samiec

Prohlášení

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

Jsem si vědom, že případné využití získaných výsledků této práce je možné použít pouze po písemném souhlasu Univerzity Karlovy v Praze.

V Praze dne 11. května 2013

Předmětová hesla: benzodiazepiny
voltametrie
pevná amalgámová elektroda

Klíčová slova: diazepam, nordiazepam
diferenční pulzní voltametrie, DC voltametrie
meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda

Abstrakt:

Byly vypracovány voltametrické metody pro stanovení diazepamu (DZ) a nordiazepamu (NDZ). Ke stanovení obou látek na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě (m-AgSAE) byly použity techniky diferenční pulzní voltametrie (DPV) a DC voltametrie (DCV).

Sledován byl vliv pH^a na velikosti intenzity signálu v prostředí směsi Brittonova-Robinsonova (BR) pufru a methanolu (9:1) a ve směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1). Byla sledována stálost signálu při opakovaném měření ve směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) a ve směsi BR pufru a methanolu (9:1). Při stanovení DZ technikou DPV a DCV bylo optimální prostředí $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Při stanovení NDZ technikou DPV a DCV bylo optimální prostředí BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Za těchto podmínek byly změřeny lineární kalibrační závislosti.

Koncentrační rozsah DZ byl změřen technikou DCV v rozsahu $10 \cdot 10^{-5} - 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a technikou DPV v rozsahu $10 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Koncentrační rozsah NDZ byl změřen pomocí techniky DCV v rozsahu $10 \cdot 10^{-5} - 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a technikou DPV v rozsahu $10 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Mez stanovitelnosti byla vypočítána u DZ na $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ technikou DPV a na $6,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ pomocí techniky DCV. Mez stanovitelnosti NDZ byla vypočítána na $1,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ pomocí techniky DPV a na $5,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ pomocí techniky DCV.

Vyvinuté metody byly použity ke stanovení DZ ve vzorku léčiva Diazepam Slovafarma 2 mg. Vzorek léčiva byl stanoven metodou standardního přídatku ve směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a pitné vody (9:1) a ve směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH

a methanolu (9:1) pomocí techniky DPV. Touto metodou byla stanovena koncentrace DZ $1,88 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ v pitné vodě a $1,66 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ v methanolu.

Subject headings: benzodiazepines
voltammetry
solid amalgam electrode

Key words: diazepam, nordiazepam
differential pulse voltammetry, DC voltammetry
meniscus modified silver solid amalgam electrode

Abstract:

Voltammetric methods for the determination of diazepam (DZ) and nordiazepam (NDZ) were developed. Techniques differential pulse voltammetry (DPV) and DC voltammetry were used for determination of DZ and NDZ at meniscus modified silver solid amalgam electrode (m-AgSAE).

The effect of pH^a on the intensity of signal was observed in the mixture of Britton-Robinson buffer and methanol (9:1), and in the mixture of 0.1 mol.l⁻¹ NaOH and methanol (9:1). The stability of the signal during repeated measurements in the mixture of 0.1 mol.l⁻¹ NaOH and methanol (9:1), and in the mixture of BR buffer and methanol (9:1) was monitored. Optimal pH^a 13.2 of medium of 0.1 mol.l⁻¹ NaOH and methanol (9:1) was used for determination of DZ with DPV and DCV techniques. Optimal pH^a 10.1 of medium of BR buffer and methanol (9:1) was used for determination of NDZ with DPV and DCV techniques. Under these conditions linear dependencies in the calibration were measured.

Concentration range of DZ was measured with DCV in range of $10 \times 10^{-5} - 6 \times 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ and with DPV technique in range of $10 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Concentration range of NDZ was measured with DCV technique in range of $10 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ and with DPV technique in range of $10 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. The limit of detection for DZ was calculated $6.6 \times 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ with DCV and $1 \times 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ with DPV. The limit of detection for NDZ was calculated $5.5 \times 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ with DCV and $1.7 \times 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ with DPV.

Developed methods were used to determine the DZ in the drug sample of Diazepam Slovakofarma 2 mg. Drug sample was determined by standard addition method in the mixture of 0.1 mol.l^{-1} NaOH and drinking water (9:1) and in the mixture of 0.1 mol.l^{-1} NaOH and methanol (9:1) with DPV. Concentration of DZ in drinking water was determined at $1.88 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ and in methanol at $1.66 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$.

Poděkování

Chtěl bych především poděkovat školiteli RNDr. Janu Fischerovi, Ph.D. za profesionální vedení, cenné rady a připomínky k diplomové práci.

Současně bych rád poděkoval všem členům katedry analytické chemie za ochotu a pomoc, kterou mi poskytli.

Děkuji také své rodině za umožnění studia na vysoké škole, podporu při studiu a vypracování této práce.

Tato diplomová práce byla finančně podporována MŠMT ČR (MSM 0021620857) a GAČR (projekt P206/10/P087).

Obsah

1. Úvod	10
1.1 Cíl práce	10
1.2 Studované látky	11
1.2.1 Příprava diazepamu a nordiazepamu	12
1.2.2 Vlastnosti a biologické účinky diazepamu a nordiazepamu	13
1.2.3 Použité metody	14
2. Experimentální část	16
2.1 Reagencie	16
2.2 Aparatura	16
2.3 Meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda	17
2.4 Pracovní postupy	17
2.5 Stálost zásobního roztoku	19
3. Výsledky a diskuze	21
3.1 Voltametrické stanovení diazepamu na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě pomocí DC voltametrie	21
3.2 Voltametrické stanovení diazepamu na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě pomocí DP voltametrie	30
3.3 Voltametrické stanovení nordiazepamu na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě pomocí DC voltametrie	43
3.4 Voltametrické stanovení nordiazepamu na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě pomocí DP voltametrie	50
4. Závěr	57
5. Literatura	59

Seznam použitých zkratk a symbolů

A	absorbance [AU]
BDZ	benzodiazepiny
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
c	molární koncentrace [mol.l^{-1}]
CAS Registry Number	registrační číslo společnosti Chemical Abstract Service
CSV	katodická rozpouštěcí voltametrie
CV	cyklická voltametrie
DCV	DC voltametrie
DPV	diferenční pulzní voltametrie
DZ	diazepam
ECD	detektor elektronového záchytu
E_{fin}	zápornější regenerační potenciál
E_{in}	kladnější regenerační potenciál
E_p	potenciál píku u DPV, půlvlna potenciálu u DCV [mV]
GC	plynová chromatografie
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
I_p	proud píku u DPV, proud vlny u DCV [nA]
LOQ	mez stanovitelnosti [mol.l^{-1}]
m-AgSAE	meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda
M_r	relativní molekulová hmotnost [g.mol^{-1}]
MS	hmotnostní spektrometrie
N	pořadové číslo měření
NDZ	nordiazepam
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
pH^a	pH směsného vodně-methanolického roztoku
RSD	relativní směrodatná odchylka
SWV	square wave voltametrie
t	čas [s]

UV	ultrafialová oblast
ν	rychlost měření [$\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$]
λ	vlnová délka [nm]

1. ÚVOD

1.1 Cíl práce

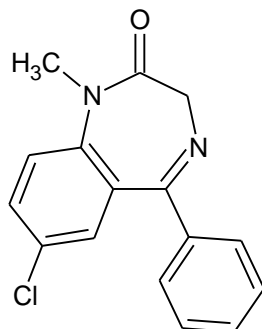
Předkládaná diplomová práce se zabývá vývojem elektrochemických metod pro stanovení psychoaktivních sloučenin, které se využívají v lékařství jako sedativa, myorelaxancia. Do této skupiny látek patří i studované látky diazepam (DZ) a nordiazepam (NDZ).

Cílem diplomové práce bylo nalezení optimálních podmínek pro stanovení diazepamu a nordiazepamu s dosažením co nejnižší meze stanovitelnosti.

K získání těchto výsledků byly využity voltametrické techniky diferenční pulzní voltametrie (DPV) a DC voltametrie (DCV) na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě (m-AgSAE).

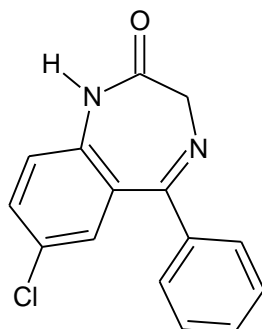
1.2 Studované látky

Studovanými látkami byly diazepam (7-chlor-1-methyl-5-fenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on, struktura na Obr. 1.2.1) a nordiazepam (7-chlor-5-fenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on, struktura na Obr. 1.2.2), jejichž základní vlastnosti jsou shrnuty v Tab. 1.2.1.



Obr. 1.2.1

Struktura DZ



Obr. 1.2.2

Struktura NDZ

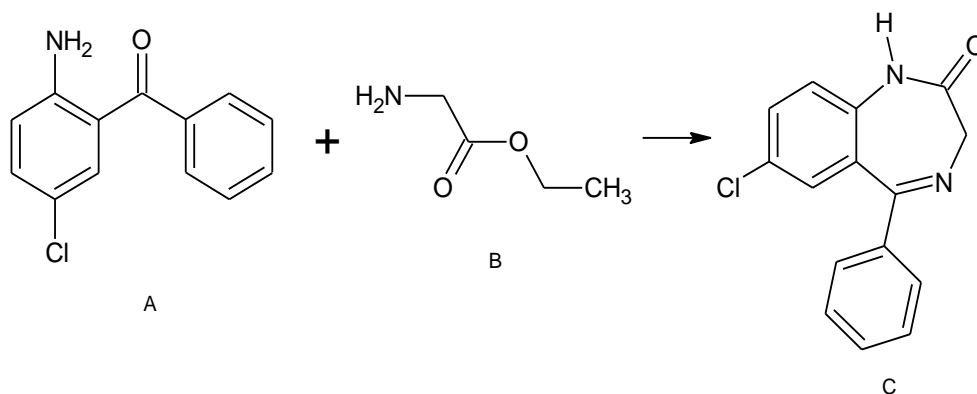
Tab. 1.2.1

Popis studovaných látek [1]

Studované látky	CAS Registry Number	Sumární vzorec	M _r (g.mol ⁻¹)
Diazepam	439-14-5	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	284,7
Nordiazepam	1088-11-5	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O	270,7

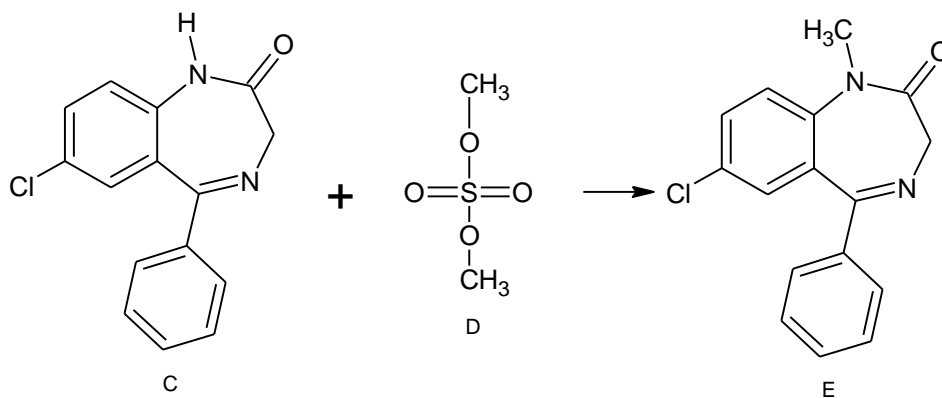
1.2.1 Příprava diazepamu a nordiazepamu

Nejjednodušší příprava DZ a NDZ vychází ze základní látky 2-amin-5-chlorbenzofenonu (A), která reaguje s ethylesterem glycinu (B) za vzniku NDZ (C) [2]. Při přípravě DZ se vychází z NDZ (C), který reaguje s dimethylsulfátem (D) za vzniku DZ (E) [3]. Reakce jsou zobrazeny na Obr. 1.2.1.1 a Obr. 1.2.1.2.



Obr. 1.2.1.1

Příprava NDZ



Obr. 1.2.1.2

Příprava DZ

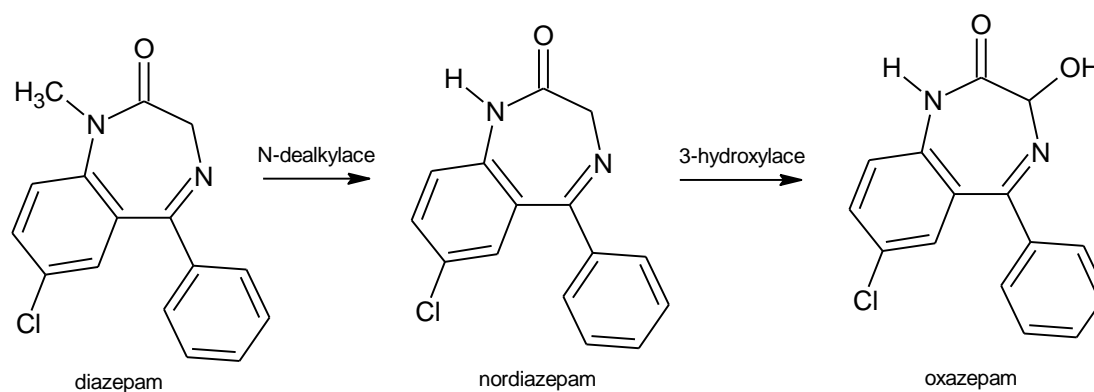
1.2.2 Vlastnosti a biologické účinky diazepamu a nordiazepamu

DZ se průmyslově vyrábí jako léčivo. Prodává se pod různými obchodními názvy jako Apaurin, Seduxen, Stesolid, Diazepam Desitin [1, 4].

V lékařství se DZ využívá pro své antikonvulzivní a anxiolytické účinky [5, 6]. Léčiva s antikonvulzivním účinkem se podávají pacientům k zabránění vzniku křečí [7, 8]. Anxiolytika, která snižují úzkost a strach, se podávají pacientům s depresemi [9, 10].

NDZ se průmyslově vyrábí také jako léčivo [11]. Prodává se pod obchodními názvy Nordaz, Stilny, Madar, Calmday. NDZ se používá pro svůj hypnotický účinek [1, 12].

Benzodiazepiny (BDZ) se podávají orálně a injekčně. Vážou se na proteiny v plazmě a snadno se rozpouštějí v tucích [11, 12]. Ihned po vstupu do těla se lehce distribuují do všech tkání [10]. BDZ jsou eliminovány prostřednictvím metabolismu jater [13]. DZ je pomocí demethylace přeměněn na NDZ, který se následně hydroxyluje na oxazepam. Oxazepam je vyloučen z těla močí [14, 15].



Obr. 1.2.2.1

Metabolická přeměna DZ v těle

BDZ můžeme rozdělit do tří skupin podle rychlosti poločasu eliminace na pomalé, střední, rychlé [16]. Poločas eliminace je ovlivněn hlavně faktorem pohlaví, věku a tělesné hmotnosti [16,17]. Obě studované látky patří do skupiny pomalé eliminace, konkrétně u DZ je poločas eliminace 14 – 70 hodin a u NDZ je poločas eliminace 48 – 119 hodin [18].

Mezi nežádoucí účinky těchto látek patří vyšší návykovost, únava, bolest hlavy, svalová ochablost, porucha řeči a paměti [4, 19, 20].

1.2.3 Použité metody

Snadná elektrochemická redukovatelnost dvojné vazby v BDZ nám umožňuje použití elektroanalytické metody typu DPV a DC voltametrie [21, 22].

V současnosti se pro stanovení elektrochemicky redukovatelných analytů používají pevné elektrody na bázi tuhého amalgámu. To zejména proto, že vysoká toxicita par rtuti vedla k omezení využívání rtuťových elektrod [23]. Mezi výhody použití pevných elektrod na bázi tuhého amalgámu patří jejich netoxicity, robustnost a snadná obsluha. Z tohoto důvodu byla zvolena pro stanovení těchto látek meniskem modifikovaná pevná stříbrná amalgámová elektroda (m-AgSAE).

Výběr metody při stanovení DZ a NDZ závisí na biologické matrici a koncentraci analytu. Lékopisná metoda stanovení se provádí spektrofotometriky v oblasti UV záření. DZ se rozpustí v kyselině sírové a zředí se methanolem. Při vlnové délce 242 nm má své charakteristické absorpční maximum. Mezi další metody používané při analýze těchto látek patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC) a UV spektrofotometrie.

Tab. 1.2.3.1

Přehled vybraných metod zabývajících se stanovením BDZ

Studovaná látka	Matrice vzorku	Metoda/detektor	Mez detekce (mol.l ⁻¹)	Literatura	
DZ	léčivo	SWV/HMDE	1.10 ⁻⁸	24	
		CSV/HMDE	2.10 ⁻⁹	24	
	moč	DPV, CV	2,1.10 ⁻⁸	25	
		s modifikovanou pastovou elektrodou			
		hydrogel	HPLC/UV	6,9.10 ⁻⁶	26
	plazma	GC/ECD	3,5.10 ⁻⁸	27	
	čistá forma	UV	3.10 ⁻⁶	28	
NDZ	plazma	GC/MS	9,2.10 ⁻⁸	29	
		GC/ECD	3,5.10 ⁻⁸	30	

2. Experimentální část

2.1 Reagencie

Zásobní roztoky DZ (Sigma-Aldrich, D0899), NDZ (Sigma-Aldrich, D7282), o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním vypočítaného a přesně naváženého množství látky v 10 ml methanolu. Roztoky o nižších koncentracích pro měření kalibrační závislosti byly připraveny zředěním zásobního roztoku pomocí methanolu. Zásobní roztoky DZ a NDZ byly uskladněny v chladu a temnu.

Použitými chemikáliemi byly kyselina fosforečná 85%, kyselina boritá (Lachema, Brno), kyselina octová 98%, hydroxid sodný, methanol, chlorid draselný (Lach-Ner, Neratovice).

K přípravě vodných roztoků byla používána deionizovaná voda (Millipore-Q plus systém, Millipore, USA).

Brittonovy-Robinsonovy pufrы o daném pH byly připraveny smícháním zásadité složky $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a kyselé složky obsahující kyselinu fosforečnou, kyselinu boritou a kyselinu octovou, každá o koncentraci $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$.

2.2 Aparatura

K voltametričkému měření byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 5.1 Pro, firma Polaro-Sensors, Praha, ČR. Tento software pracoval na operačním systému Windows XP. K voltametričkému měření byl použit tříelektrodový systém, tvořený referentní argentchloridovou elektrodou (3 mol.l^{-1} KCl) typu RAE 113, pomocnou platinovou elektrodou (plíšek typu PPE, Monokrystal, Turnov) a jako pracovní elektroda byla použita m-AgSAE (viz kapitola 2.3).

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Pye-Unicam PU 8800 UV/VIS Spectrophotometer (Cambridge, Velká Británie). Roztoky byly měřeny v křemenných kyvetách o tloušťce 1 cm.

Ke kalibraci pH-metru Jenway 4330 (Jenway, Essen, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005) byly použity kalibrační pufrы o pH o hodnotách 4, 7, 10 při laboratorní teplotě.

2.3 Meniskem modifikovaná stříbrná amalgámová pevná elektroda

Při analýze DZ a NDZ byla použita m-AgSAE (č. 04-2010-05 o průměru 0,5 mm, vyrobena firmou Polaro-Sensors). Tento typ elektrody byl vyvinut v laboratoři ÚFCH JH AV.

Pro získání opakovatelných signálů byly s elektrodou prováděny tři předúpravné kroky [32]:

Amalgamace: Pracovní elektroda byla ponořena do zásobníku kapalně rtuti přibližně na 10 s, než se obnovil celý meniskus. Amalgamace se prováděla po delším přerušení měření, tj. po dvou dnech.

Elektrochemická aktivace: Aktivace pracovní elektrody byla prováděna v roztoku $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ KCl při vloženém napětí $-2,2 \text{ V}$ po dobu 300 s. Elektrochemická aktivace slouží k vyčištění povrchu elektrody, byla prováděna ihned po amalgamací pracovní elektrody a po přibližně hodinovém přerušení měření.

Regenerace: Tento krok se prováděl v analyzovaném roztoku při míchání a probublávání roztoku dusíkem. Na elektrodu bylo vkládáno skokové střídání konstantního kladnějšího potenciálu E_{in} a zápornějšího konstantního potenciálu E_{fin} v intervalech 0,1 s po dobu 30 s.

2.4 Pracovní postupy

Při voltametrických měřeních bylo do odměrné baňky o objemu 10 ml odpipetováno dané množství zásobního roztoku studované látky (0 – 1 ml) v methanolu a doplněno methanolem na objem 1 ml. Takto připravená odměrná baňka byla doplněna BR pufrem o zvoleném pH, nebo roztokem $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH po rysku. Roztok byl převeden do voltametrické cely. Kyslík byl odstraněn probubláváním pomocí dusíku po dobu

5 minut. Následně byla zaznamenána voltametrická křivka. Při každé změně pH nebo přerušení měření na dobu delší než 1 hodina byla elektroda znovu aktivována.

Při měření kalibračních závislostí byly vkládány regenerační pulzy, které jsou uvedeny v tabulce 2.4.1.

Tab. 2.4.1

Vkládané regenerační pulzy při měření kalibrační závislosti DZ a NDZ, měřené technikou DPV a DCV na m-AgSAE ve směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2 a ve směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1.

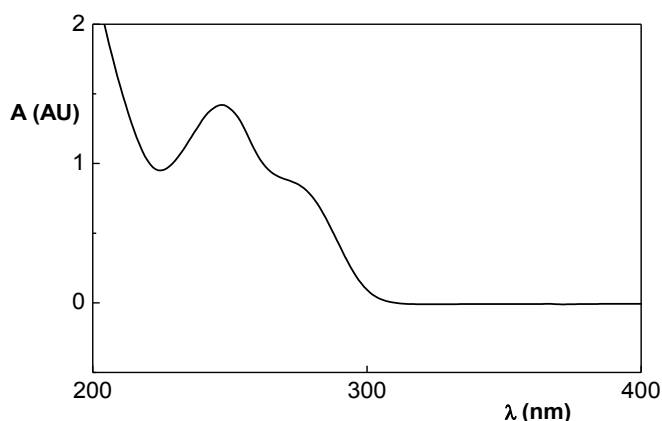
Studovaná látka	DZ	NDZ
E_{in} (mV)	-1000	-800
E_{fin} (mV)	-1400	-1400
Prostředí	$0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanol (9:1)	BR pufr o pH 10 a methanol (9:1)

Při stanovení DZ ve vzorku léčiva byla nejdříve zvážena tableta (0,1112 g). Následně se jedna tableta rozpustila v 250 ml methanolu a odpipetovalo se 0,5 ml tohoto roztoku do každé ze tří odměrných baněk o objemu 10 ml. Do odměrných baněk se také odpipetovalo příslušné množství roztoku DZ (0, 100, 200 μl o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$). Odměrné baňky byly doplněny $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH. Při analýze DZ rozpouštěného v pitné vodě se postupovalo následovně. Zvážená tableta (0,1118 g) byla rozpuštěna v 250 ml pitné vody. Z takto připraveného roztoku se odpipetovalo 0,5 ml do každé ze tří odměrných baněk o objemu 10 ml. Do odměrných baněk se odpipetovalo i příslušné množství roztoku DZ (0, 100, 200 μl o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$). Odměrné baňky byly doplněny $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH. Takto připravené roztoky byly použity pro voltametrické měření.

Všechna měření byla provedena třikrát a následně statisticky vyhodnocena. Měření byla prováděna při laboratorní teplotě.

2.5 Stálost zásobních roztoků

Stálost zásobních roztoků DZ a NDZ o koncentracích $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ v methanolu byla sledována spektrofotometricky v křemenných kyvetách o tloušťce 1 cm. Srovnávací kyveta byla naplněna methanolem. Absorbance zásobního roztoku DZ byla měřena při vlnové délce 246 nm a u zásobního roztoku NDZ byla měřena při vlnové délce 239 nm, kde měly studované látky absorpční maximum. Hodnota molárního absorpčního koeficientu při výše uvedených vlnových délkách činila $1,41 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro DZ a $1,52 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro NDZ. Absorpční spektrum DZ je uvedeno na Obr. 2.5.1 a výsledky měření stálosti zásobního roztoku jsou uvedeny v Tab. 2.5.1.



Obr. 2.5.1

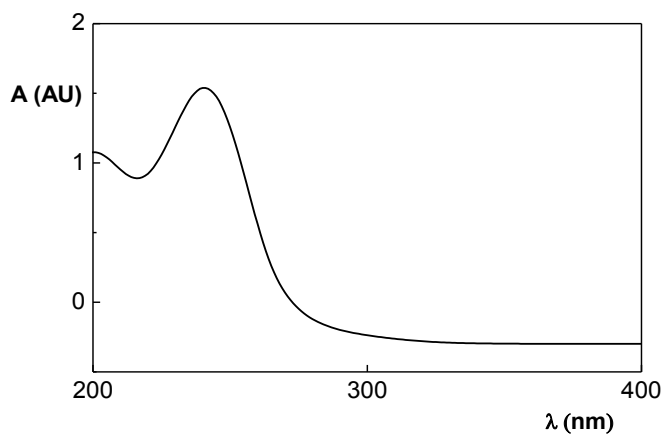
Absorpční spektrum roztoku DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v methanolu. Měřeno proti methanolu v křemenné kyvetě o tloušťce 1 cm.

Tab. 2.5.1

Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v methanolu. Číselné hodnoty udávají relativní hodnotu koncentrace v % proti hodnotě koncentrace čerstvě připraveného roztoku.

Dny	1	7	14	21	28
A_{246}	1,406	1,402	1,4	1,386	1,380
(%)	100	99,7	99,6	98,6	98,2

Absorpční spektrum NDZ je uvedeno na Obr. 2.5.2 a výsledky měření stálosti zásobního roztoku jsou uvedeny v Tab. 2.5.2. Z měření vyplývá, že složení obou roztoků se během měsíce významně nemění, proto je možné používat roztoky po několik týdnů.



Obr 2.5.2

Absorpční spektrum roztoku NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v methanolu. Měřeno proti methanolu v křemenné kyvetě o tloušťce 1 cm.

Tab. 2.5.2

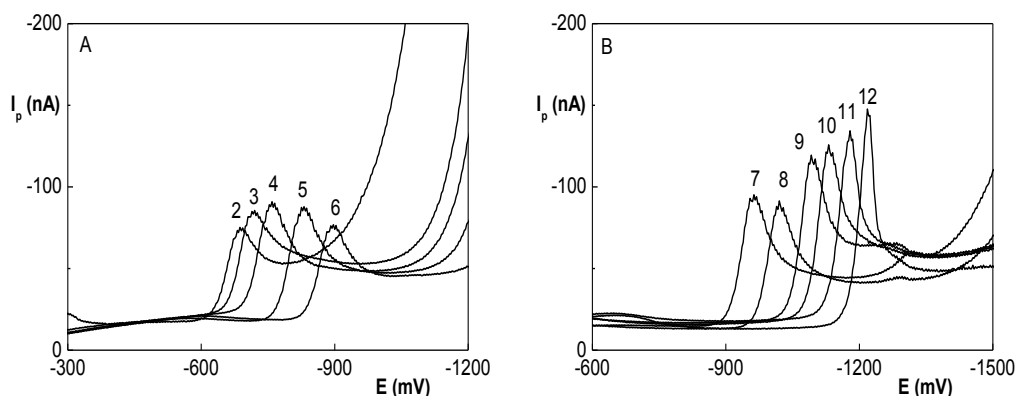
Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v methanolu. Číselné hodnoty udávají relativní hodnotu koncentrace v % proti hodnotě koncentrace čerstvě připraveného roztoku.

Dny	1	7	14	21	28
A_{239}	1,502	1,494	1,482	1,49	1,493
(%)	100	99,5	98,6	99,2	99,4

3. Výsledky a diskuze

3.1 Voltametrické stanovení diazepamu na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě pomocí DC voltametrie

Ke zjištění závislosti intenzity signálu DZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na velikosti pH^a směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0 byla použita technika DC voltametrie. Velikost pH^a směsi vodně-methanolického roztoku se nelišila výrazně od pH vodného roztoku. Látka v této oblasti pH^a poskytovala jeden signál. Pro lepší přehled jsou naměřené voltametrické křivky rozděleny a znázorněny na Obr. 3.1.1.



Obr. 3.1.1

DC voltamogramy DZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) byly měřeny technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1). Měření byla prováděna bez regenerace elektrody. Čísla nad voltamogramy odpovídají danému pH roztoku při různých pH .

Metodou lineární regrese byla prokázána lineární závislost intenzity signálu DZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na velikosti pH^a ve směsi BR pufru a methanolu (9:1).

Touto metodou byl vypočten vztah pro závislost potenciálu vlny E_p na pH^a roztoku v rozsahu pH^a 2,1 – 12,0:

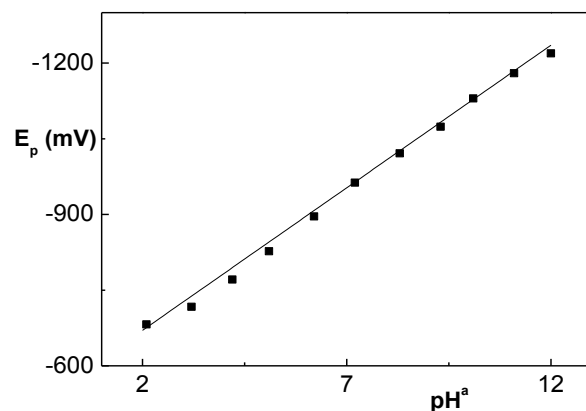
$$E_p(\text{mV}) = -56,5 \text{ pH}^a - 557,281 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9967)$$

Hodnoty E_p a I_p pro měřená pH^a roztoků jsou shrnuty do Tab. 3.1.1 a jejich závislosti zobrazeny na Obr. 3.1.2 a Obr. 3.1.3.

Tab. 3.1.1

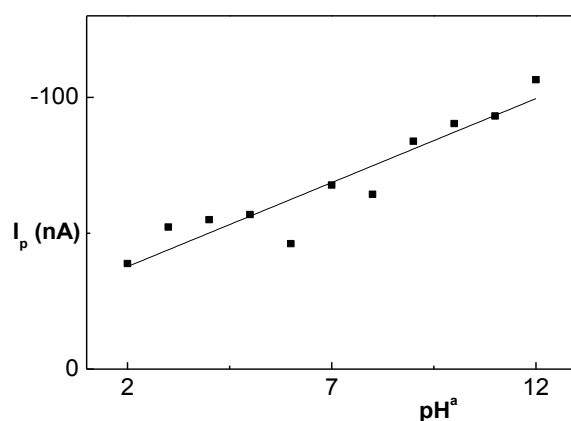
Hodnoty E_p a I_p roztoků DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v prostředí o různých pH^a byly měřeny na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) při různých měřeních.

Prostředí	pH^a	E_p (mV)	I_p (nA)
směs BR pufru pH 2,0 a methanolu (9:1)	2,1	-687	-38,8
směs BR pufru pH 3,0 a methanolu (9:1)	3,2	-717	-52,2
směs BR pufru pH 4,0 a methanolu (9:1)	4,2	-758	-54,9
směs BR pufru pH 5,0 a methanolu (9:1)	5,1	-827	-56,8
směs BR pufru pH 6,0 a methanolu (9:1)	6,2	-896	-46,2
směs BR pufru pH 7,0 a methanolu (9:1)	7,2	-963	-67,4
směs BR pufru pH 8,0 a methanolu (9:1)	8,3	-1021	-64,3
směs BR pufru pH 9,0 a methanolu (9:1)	9,3	-1094	-83,8
směs BR pufru pH 10,0 a methanolu (9:1)	10,1	-1123	-90,3
směs BR pufru pH 11,0 a methanolu (9:1)	11,1	-1160	-93,1
směs BR pufru pH 12,0 a methanolu (9:1)	12,0	-1180	-106,5
roztok NaOH ($0,01 \text{ mol.l}^{-1}$) a methanolu (9:1)	12,0	-1209	-99,6
roztok NaOH ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$) a methanolu (9:1)	13,2	-1240	-109,2



Obr. 3.1.2

Závislost potenciálu vlny E_p DZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^a roztoku byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0.

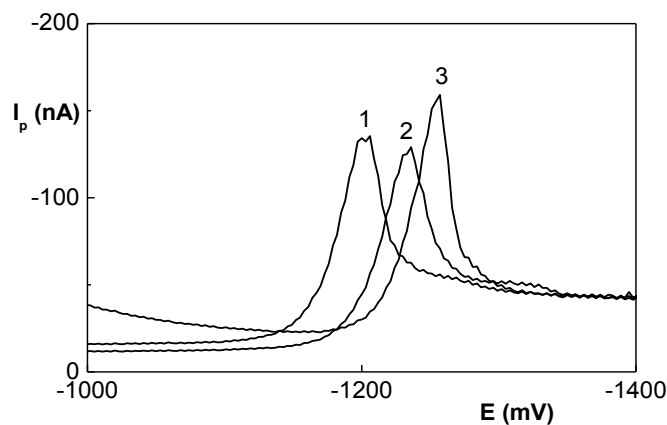


Obr. 3.1.3

Závislost proudu vlny I_p DZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^a roztoku byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0.

Jako optimální prostředí z rozmezí hodnot pH^a 2,1 – 12,0 bylo nejprve vybráno prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 12,0. Následně bylo porovnáno prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a 12,0 s roztoky NaOH

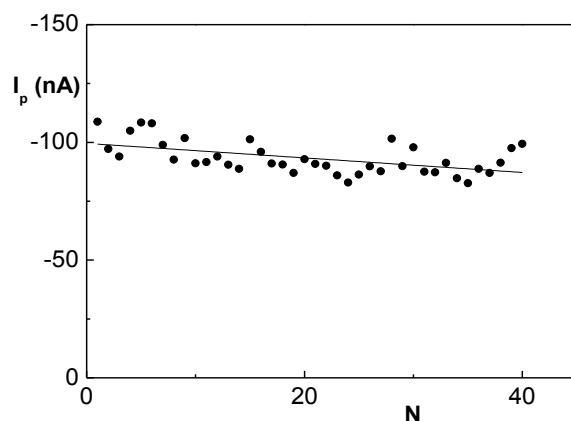
(o koncentraci $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ a $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$) a methanolu (9:1), pro které jsou voltamogramy zobrazeny na Obr. 3.1.4. Jako nové optimální prostředí pro analýzu DZ bylo zvoleno prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2, kde DZ poskytoval nejvyšší intenzitu signálu.



Obr. 3.1.4

DC voltamogramy DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) byly měřeny technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 12,0 (1), $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 12,0 (2), $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2 (3). Měření byla prováděna bez regenerace pracovní elektrody.

Závislost stability signálu DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na opakovaném měření v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2 je zobrazena na Obr. 3.1.5. Z tohoto obrázku je patrný pokles signálu ($\text{RSD} = 7,1 \%$ pro 40 měření). Míra poklesu byla přijatelná pro analytické stanovení látky. Z tohoto důvodu nebyla prováděna další optimalizace.



Obr. 3.1.5

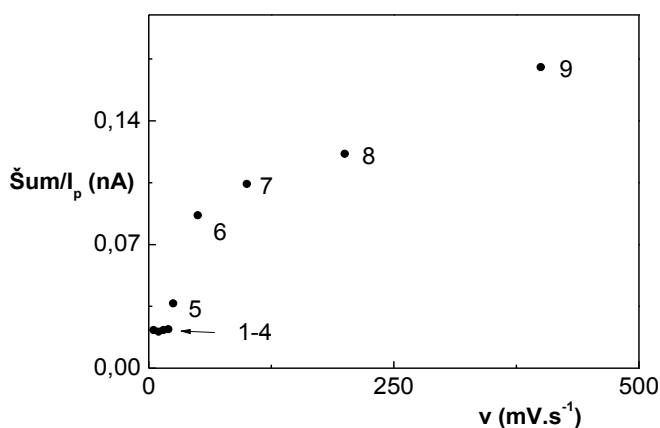
Závislost stability signálu DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na opakovaném měření byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2 (RSD = 7,1 % pro 40 měření). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV .

Dále byla zkoumána závislost citlivosti měření na rychlosti skenu 5, 10, 15, 25, 50, 100, 200, 400 mV.s^{-1} DZ ($c = 10 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) metodou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Tato závislost je zobrazena na Obr. 3.1.6. Z obrázku je patrné, že poměr šumu a signálu zůstává konstantní do 15 mV.s^{-1} a začíná narůstat až od 25 mV.s^{-1} . Optimální rychlost skenu byla proto zvolena 20 mV.s^{-1} . Závislost poměru šumu/ I_p na rychlosti skenu jsou shrnuty do Tab. 3.1.2.

Tab. 3.1.2

Závislost šumu/ I_p na rychlosti skenu

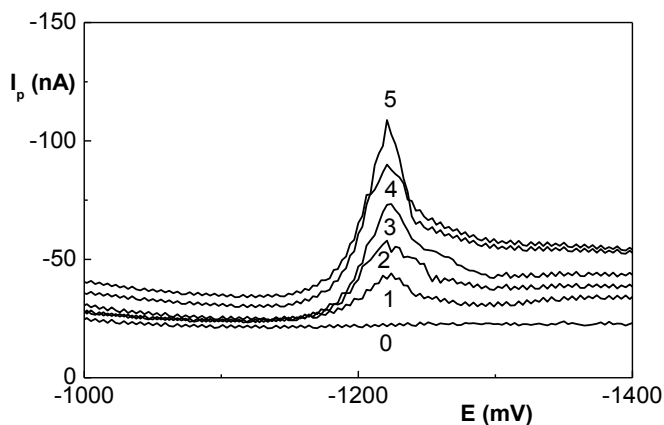
Rychlost ($\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$)	Šum (nA)	I_p (nA)	Šum/ I_p
5	-0,097	-4,498	0,022
10	-0,153	-7,394	0,021
15	-0,166	-7,669	0,021
20	-0,172	-7,745	0,022
25	-0,372	-10,134	0,037
50	-0,875	-10,186	0,086
100	-1,362	-13,043	0,104
200	-2,041	-16,815	0,121
400	-3,044	-17,861	0,171



Obr. 3.1.6

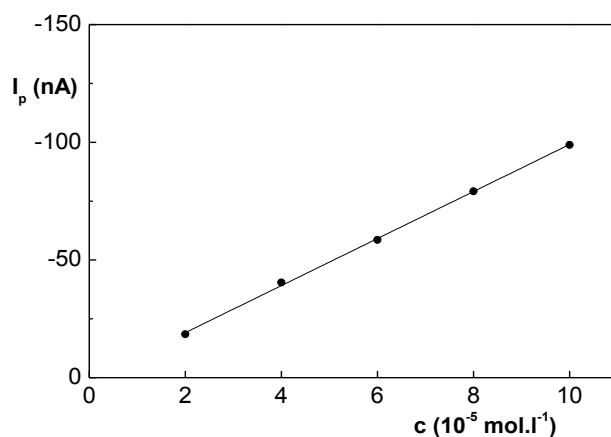
Závislost šumu/ I_p křivky DZ ($10\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) na rychlosti skenu. Měření bylo prováděno technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV . Měřené rychlosti: $5, 10, 15, 20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (1 – 4), $25 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (5), $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (6), $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (7), $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (8), $400 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (9).

Koncentrační závislost DZ byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2 s vkládanými regeneračními pulzy. Byly měřeny koncentrační rozsahy DZ $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a $(6 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Nižší koncentrace nebyly měřeny kvůli obtížnému vyhodnocení DC voltametrické vlny DZ. Kalibrační závislost DZ v koncentračním rozsahu $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a související závislost velikosti I_p na koncentraci jsou zobrazeny na Obr. 3.1.7 a Obr. 3.1.8. Kalibrační závislost DZ v koncentračním rozsahu $(6 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a související závislost velikosti I_p na koncentraci jsou zobrazeny na Obr. 3.1.9 a Obr. 3.1.10. Parametry kalibrační přímky pro stanovení DZ metodou DCV na m-AgSAE v prostředí $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2 jsou shrnuty v Tab. 3.1.3.



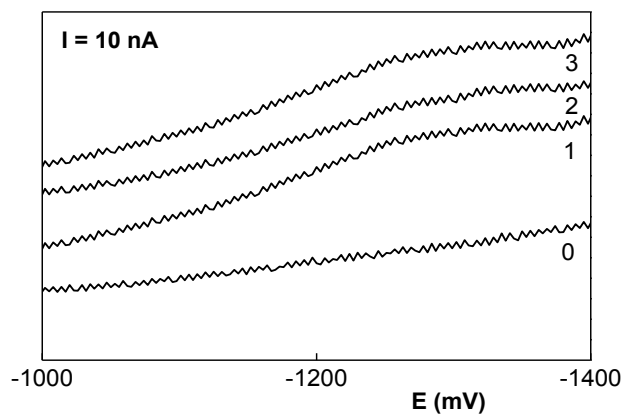
Obr. 3.1.7

DC voltamogramy DZ byly měřeny technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Koncentrace (DZ): 0 (0), $2 \cdot 10^{-5}$ (1), $4 \cdot 10^{-5}$ (2), $6 \cdot 10^{-5}$ (3), $8 \cdot 10^{-5}$ (4), $10 \cdot 10^{-5}$ (5) mol.l^{-1} . Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV .



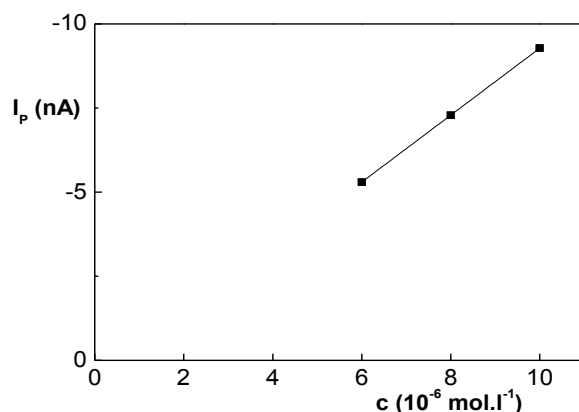
Obr. 3.1.8

Závislost proudu vlny I_p na koncentraci DZ v rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 10 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV .



Obr. 3.1.9

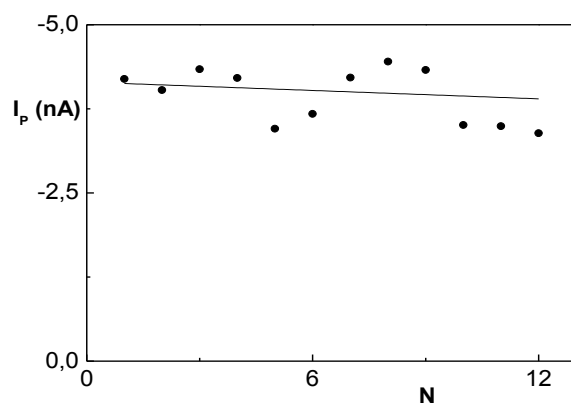
DC voltamogramy DZ byly měřeny technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Koncentrace (DZ): 0 (0), $6 \cdot 10^{-6}$ (1), $8 \cdot 10^{-6}$ (2), $10 \cdot 10^{-6}$ (3) mol.l^{-1} . Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV .



Obr. 3.1.10

Závislost proudu vlny I_p na koncentraci DZ v rozmezí $6 \cdot 10^{-6} - 10 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV .

Mez stanovitelnosti byla vypočtena z opakovaných měření DZ o koncentraci $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ (zobrazena na Obr. 3.1.11). RSD z 12 měření byla 10,2 %, čemuž odpovídá mez stanovitelnosti DZ na $6,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$.



Obr. 3.1.11

Závislost I_p DZ na opakovaných měřeních byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Měřená koncentrace DZ byla $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV .

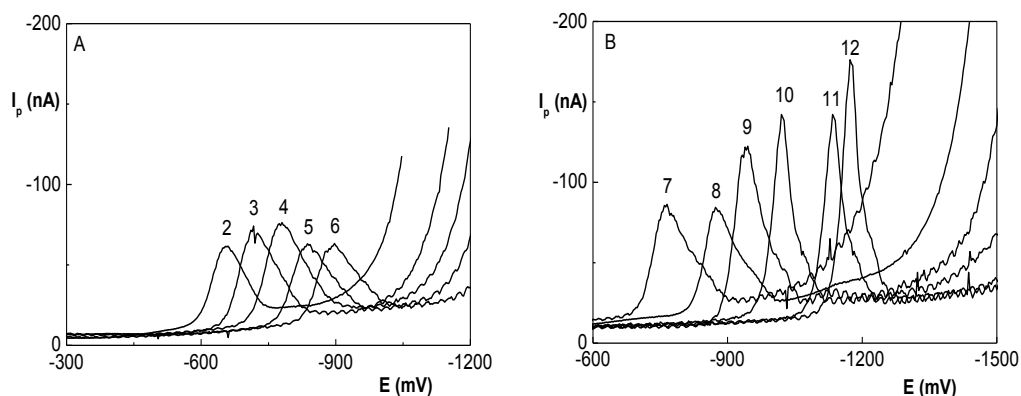
Tab. 3.1.3

Parametry kalibrační přímky pro stanovení DZ metodou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.

c [mol.l ⁻¹]	Směrnice [nA.mol ⁻¹ .l]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	LOQ [mol.l ⁻¹]
(2 – 10).10 ⁻⁵	-1,5	-0,8	0,9964	–
(6 – 10).10 ⁻⁶	-6,75	-0,995	0,9971	6,6.10 ⁻⁶

3.2 Voltametrické stanovení diazepamu na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě pomocí DP voltametrie

Ke zjištění závislosti intenzity signálu DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na velikosti pH^a ve směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0 byla použita technika DPV. Látka v této oblasti pH^a poskytovala jeden signál. Velikost pH^a směsi vodně-methanolickeho roztoku se nelišila výrazně od pH vodného roztoku. Pro lepší přehled jsou naměřené voltametrické křivky rozděleny a znázorněny na Obr. 3.2.1.



Obr. 3.2.1

DP voltamogramy DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1). Měření byla prováděna bez regenerace elektrody. Čísla nad voltamogramy odpovídají danému pH roztoku při různých pH.

Metodou lineární regrese byla prokázána lineární závislost intenzity signálu DZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na velikosti pH^a ve směsi BR pufru a methanolu (9:1). Touto metodou byl vypočten vztah pro závislost potenciálu vlny E_p na pH^a roztoku v rozsahu pH^a 2,1 – 12,0:

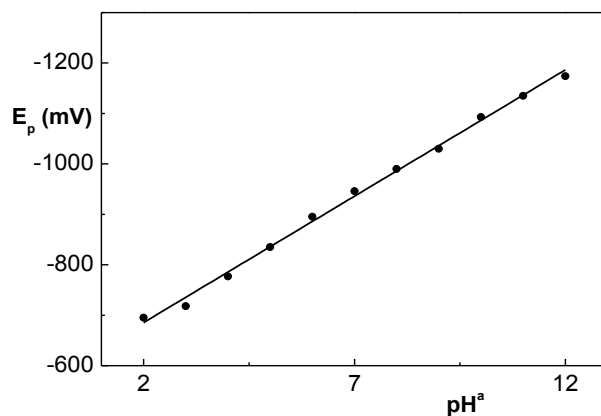
$$E_p(\text{mV}) = -50,109 \text{ pH}^a - 585,236 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9963)$$

Hodnoty E_p a I_p DZ pro měřená pH^a roztoků jsou shrnuty v Tab. 3.2.1 a jejich závislosti zobrazeny na Obr. 3.2.2 a Obr. 3.2.3.

Tab. 3.2.1

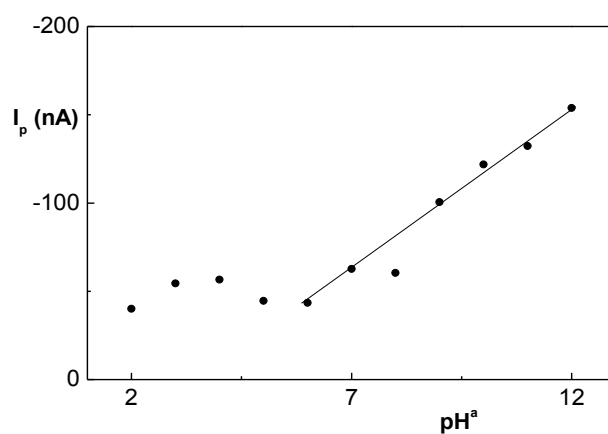
Hodnoty E_p a I_p roztoků DZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v prostředí o různých pH^a byly měřeny na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) při různých měřeních.

Prostředí	pH^a	E_p (mV)	I_p (nA)
směs BR pufru pH 2,0 a methanolu (9:1)	2,1	-695	-40,1
směs BR pufru pH 3,0 a methanolu (9:1)	3,2	-718	-54,5
směs BR pufru pH 4,0 a methanolu (9:1)	4,2	-777	-56,5
směs BR pufru pH 5,0 a methanolu (9:1)	5,1	-835	-44,6
směs BR pufru pH 6,0 a methanolu (9:1)	6,2	-895	-43,4
směs BR pufru pH 7,0 a methanolu (9:1)	7,2	-946	-62,6
směs BR pufru pH 8,0 a methanolu (9:1)	8,3	-990	-60,6
směs BR pufru pH 9,0 a methanolu (9:1)	9,3	-1030	-100,5
směs BR pufru pH 10,0 a methanolu (9:1)	10,1	-1093	-121,8
směs BR pufru pH 11,0 a methanolu (9:1)	11,1	-1135	-132,3
směs BR pufru pH 12,0 a methanolu (9:1)	12,0	-1174	-153,9
Roztok NaOH ($0,01 \text{ mol.l}^{-1}$) a methanolu (9:1)	12,0	-1200	-147,6
Roztok NaOH ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$) a methanolu (9:1)	13,2	-1218	-155,1



Obr. 3.2.2

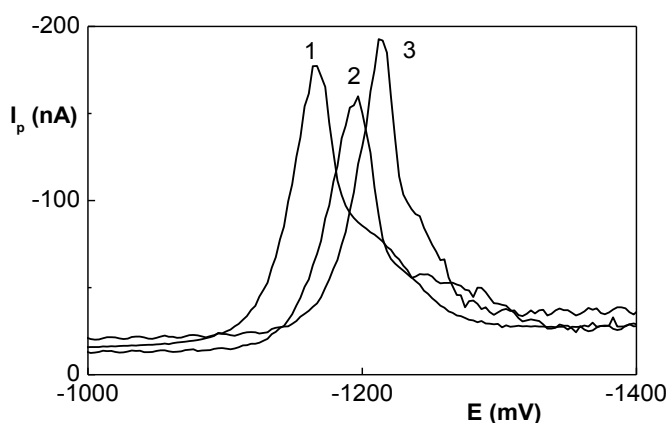
Závislost potenciálu vlny E_p DZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^a roztoku byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0.



Obr. 3.2.3

Závislost proudu vlny I_p DZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^a roztoku byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0.

Jako optimální prostředí z rozmezí hodnot pH^a 2,1 – 12,0 bylo nejprve vybráno prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 12,0. Následně bylo porovnáno prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o hodnotě pH^a 12,0 s roztoky NaOH (o koncentracích $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ a $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$) a methanolu (9:1), pro které jsou voltamogramy zobrazeny na Obr. 3.2.4. Jako nové optimální prostředí pro analýzu DZ bylo zvoleno prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2, kde signál DZ poskytoval nejvyšší intenzitu.

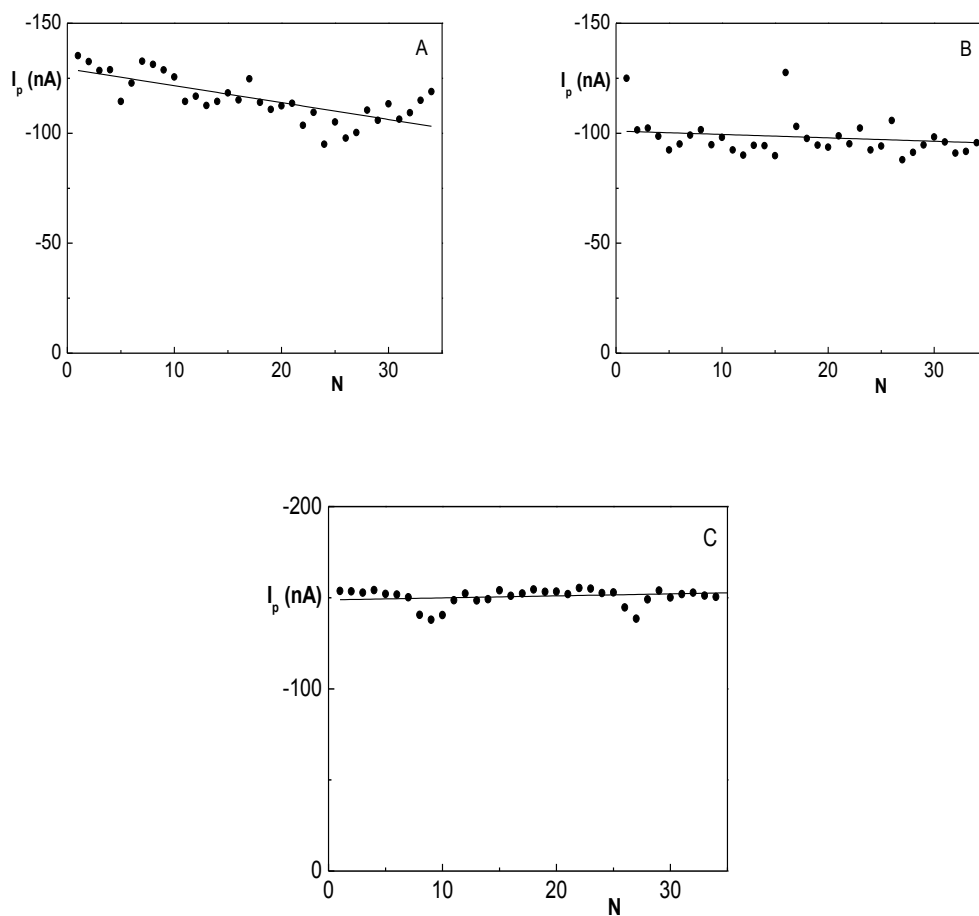


Obr. 3.2.4

DP voltamogramy DZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 12,0 (1), $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 12,0 (2) a $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2 (3).

Byla sledována závislost stability signálu DZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na opakovaném měření v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 12,0, NaOH o koncentraci $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 12,0 a NaOH o koncentraci $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2 s vkládanými regeneračními pulzy, které jsou zobrazeny na Obr. 3.2.5. Z tohoto obrázku je viditelná klesající stabilita signálu v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 12,0 (RSD = 8,9 % pro 34 měření). V prostředí směsi $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 12,0 je patrný stabilnější signál (RSD = 8,6 % pro 34 měření). Nejstabilnější signál poskytovalo prostředí směsi

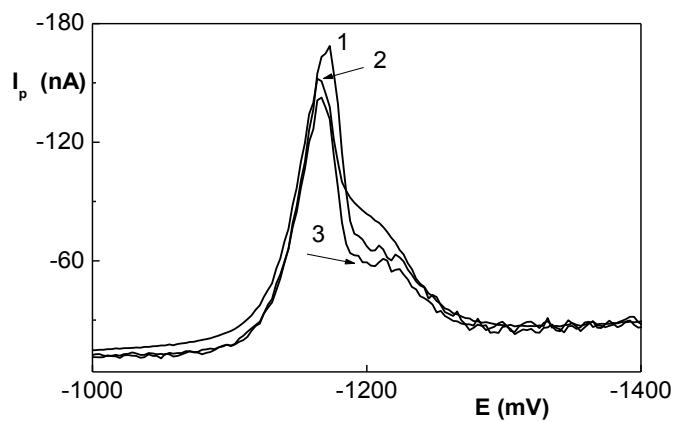
0,1 mol.l⁻¹ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2 s vkládanými regeneračními pulzy (RSD = 2,4 % pro 34 měření).



Obr. 3.2.5

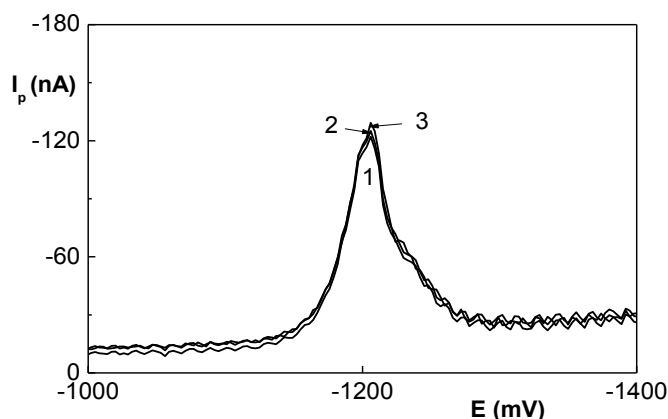
Závislost stability signálu DZ ($c = 1.10^{-4}$ mol.l⁻¹) na opakovaném měření byla měřena metodou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 12,0 (A) (RSD = 8,9 % pro 34 měření), 0,01 mol.l⁻¹ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 12,0 (B) (RSD = 8,6 % pro 34 měření), 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2 s vkládanými regeneračními pulzy (C) (RSD = 2,4 % pro 34 měření). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.

Sledována byla stabilita signálu technikou DPV na opakovaném měření (1, 20, 30) DZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v prostředích směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 12,0 a směsi 0,1 mol.l^{-1} NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2, které jsou zobrazeny na Obr. 3.2.6 a Obr. 3.2.7.



Obr. 3.2.6

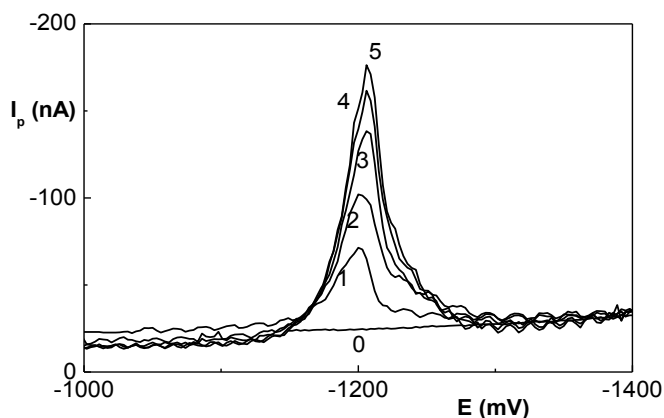
DP voltamogramy DZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 12,0. Pořadové číslo měření: 1 (1), 20 (2), 30 (3). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.



Obr. 3.2.7

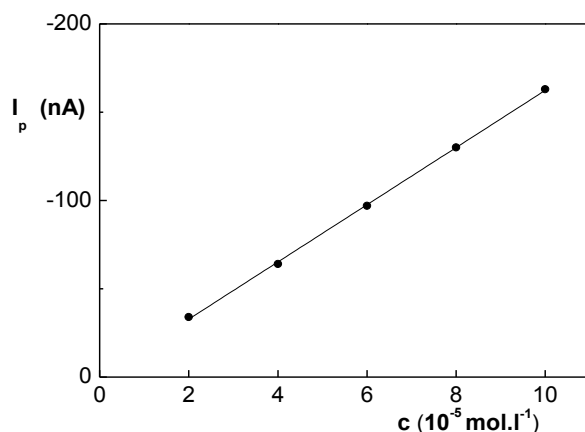
DP voltamogramy DZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Pořadové číslo měření: 1 (1), 20 (2), 30 (3). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV .

Kalibrační závislost DZ byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2 s vkládanými regeneračními pulzy. Byly měřeny koncentrační rozsahy DZ $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a $(2 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Kalibrační závislost DZ o koncentraci $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a související závislost I_p na koncentraci jsou zobrazeny na Obr. 3.2.8 a Obr. 3.2.9. Kalibrační závislost DZ o koncentraci $(2 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a související závislost I_p na koncentraci jsou zobrazeny na Obr. 3.2.10 a Obr. 3.2.11. Nižší koncentrace nebyly měřeny kvůli obtížnému vyhodnocení DP voltametričké vlny DZ. Parametry kalibrační přímky pro stanovení DZ metodou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2 jsou shrnuty v Tab 3.2.2.



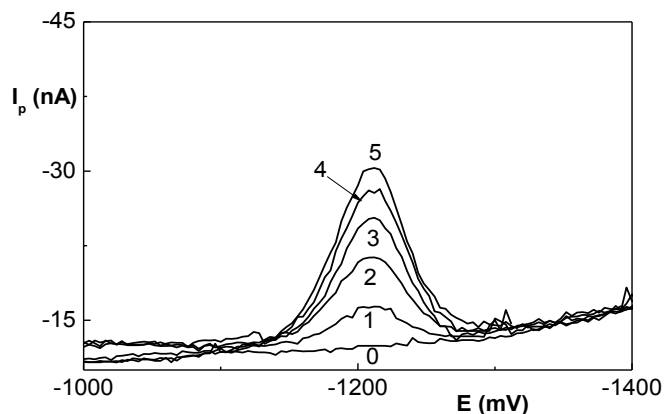
Obr. 3.2.8

DP voltamogramy DZ byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Koncentrace (DZ): 0 (0), $2 \cdot 10^{-5}$ (1), $4 \cdot 10^{-5}$ (2), $6 \cdot 10^{-5}$ (3), $8 \cdot 10^{-5}$ (4), $10 \cdot 10^{-5}$ (5) mol.l^{-1} . Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.



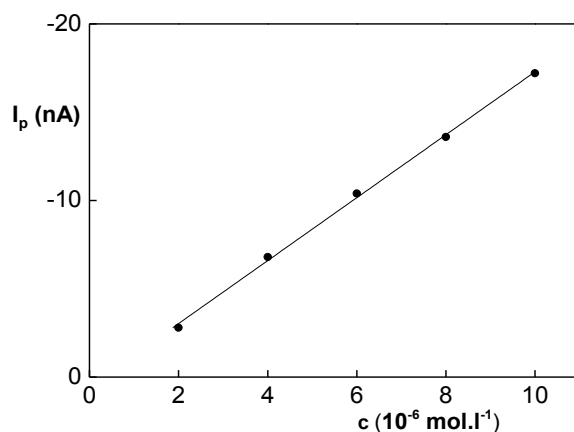
Obr. 3.2.9

Závislost proudu vlny I_p na koncentraci DZ v rozmezí $2 \cdot 10^{-5}$ – $10 \cdot 10^{-5}$ mol.l^{-1} byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.



Obr. 3.2.10

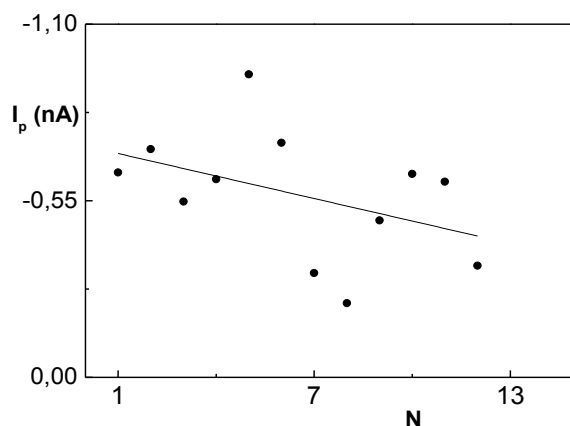
DP voltamogramy DZ byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Koncentrace (DZ): 0 (0), $2 \cdot 10^{-6}$ (1), $4 \cdot 10^{-6}$ (2), $6 \cdot 10^{-6}$ (3), $8 \cdot 10^{-6}$ (4), $10 \cdot 10^{-6}$ (5) mol.l^{-1} . Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV .



Obr. 3. 2.11

Závislost proudu vlny I_p na koncentraci DZ v rozmezí $2 \cdot 10^{-6} - 10 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV .

Mez stanovitelnosti byla vypočtena z opakovaných měření DZ ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) a je zobrazena na Obr. 3.2.12. RSD z 12 měření byla 33 %, čemuž odpovídá mez stanovitelnosti $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$.



Obr. 3.2.12

Závislost I_p DZ na opakovaných měřeních byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1). Byla měřena koncentrace (DZ) $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ (RSD = 33 % pro 12 měření). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV .

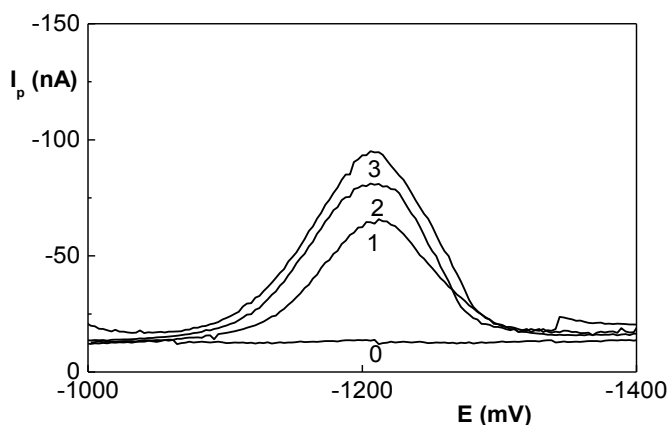
Tab. 3.2.2

Parametry kalibrační přímky pro stanovení DZ metodou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV .

c [mol.l^{-1}]	Směrnice [$\text{nA.mol}^{-1}.$]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	LOQ [mol.l^{-1}]
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	-6,67	-1,56	0,9958	-
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	-3,1	-2,65	0,9993	$1 \cdot 10^{-6}$

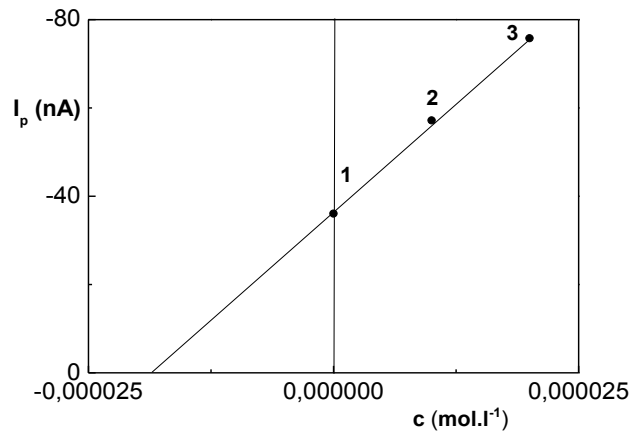
Metodou standardního přídávku byla stanovena koncentrace DZ v tabletě (2 mg) technikou DPV v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2 a v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a pitné vody (9:1) o pH^a o hodnotě 7,2. Vypočítaná koncentrace DZ v léčivu po rozpuštění ve 250 ml methanolu byla $2,81 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Na Obr. 3.2.13 a 3.2.14 jsou zobrazeny DP voltamogramy DZ

a metoda standardního přídatku v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a pitné vody (9:1) o pH^a o hodnotě 7,2. Koncentrace DZ v tomto prostředí byla stanovena na $1,85 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Na Obr. 3.2.15 a 3.2.16 jsou zobrazeny DP voltamogramy DZ a metoda standardního přídatku v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Koncentrace DZ v tomto prostředí byla stanovena na $1,65 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Získané výsledky jsou shrnuty v Tab. 3.2.3.



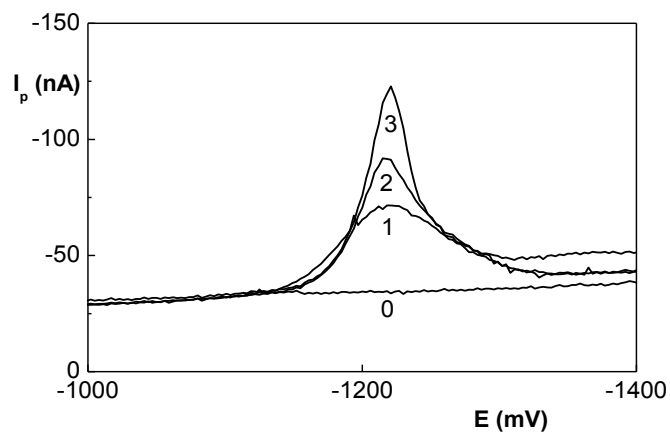
Obr. 3.2.13

DP voltamogramy DZ byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a pitné vody (9:1) o pH^a o hodnotě 7,2. Vzorek byl změřen pomocí metody standardního přídatku: $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH (0), $0 \mu\text{l}$ (1), $100 \mu\text{l}$ (2), $200 \mu\text{l}$ (3) DZ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV .



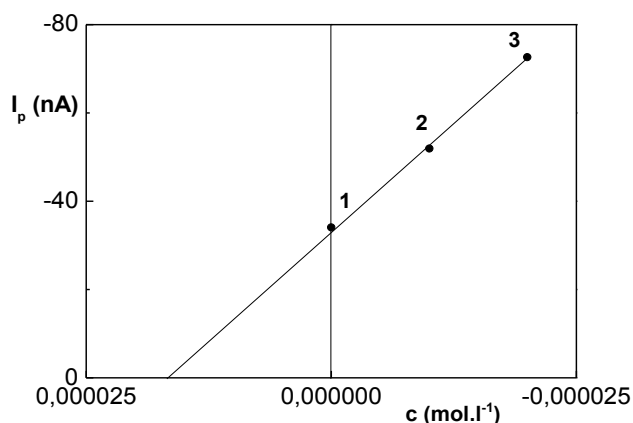
Obr. 3.2.14

Závislost proudu vlny I_p na koncentraci DZ byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a pitné vody (9:1) o pH^a o hodnotě 7,2. Vzorek byl změřen pomocí metody standardního přídávku: $0 \mu\text{l}$ (1), $100 \mu\text{l}$ (2), $200 \mu\text{l}$ (3) DZ ($c = 1.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV .



Obr. 3.2.15

DP voltamogramy DZ byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Vzorek byl změřen pomocí metody standardního přídávku: $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH (0), $0 \mu\text{l}$ (1), $100 \mu\text{l}$ (2), $200 \mu\text{l}$ (3) DZ ($c = 1.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV .



Obr. 3.2.16

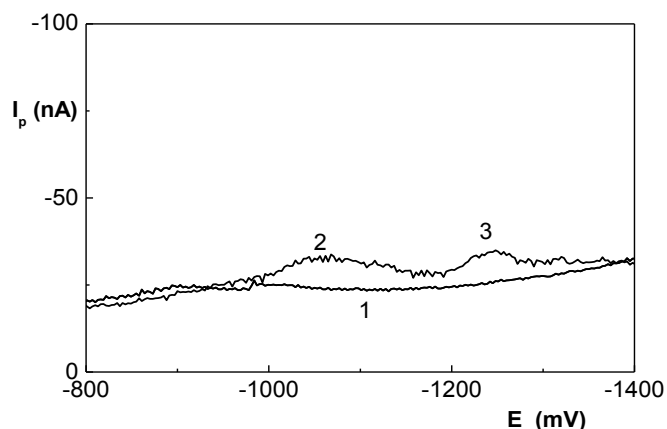
Závislost proudu vlny I_p na koncentraci DZ byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Vzorek byl změřen pomocí metody standardního přídávku: 0 μ l (1), 100 μ l (2), 200 μ l (3) DZ ($c = 1.10^{-3}$ mol.l⁻¹). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -1000 až -1400 mV.

Tab. 3.2.3

Stanovení DZ ve vzorku léčiva metodou DPV na m-AgSAE a metodou standardního přídávku v prostředí směsi 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a pitné vody (9:1) o pH^a o hodnotě 7,2 a v prostředí směsi 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2.

Látka	Prostředí (9:1)	Teoretická koncentrace (mol.l ⁻¹)	Změřená koncentrace (mol.l ⁻¹)	Výtěžek (%)
Diazepam	NaOH + methanol	$2,8.10^{-5}$	$1,66.10^{-5}$	59,3
(2 mg)	NaOH + pitná voda		$1,88.10^{-5}$	67,1

Bylo měřeno společné stanovení DZ ($c = 6.10^{-6}$ mol.l⁻¹) a NDZ ($c = 6.10^{-6}$ mol.l⁻¹) v prostředí směsi 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV. Tyto dvě látky lze stanovit vedle sebe, což je patrné z Obr. 3.2.17.

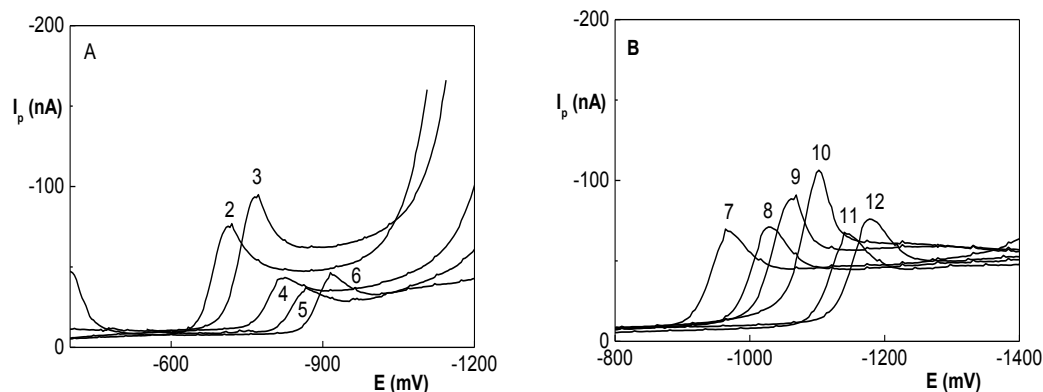


Obr. 3.2.17

DP voltamogramy DZ ($c = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) a NDZ ($c = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2 (1), DZ ($c = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) (2), NDZ ($c = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) (3). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV .

3.3 Voltametrické stanovení nordiazepamu na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě pomocí metody DC voltametrie

Ke zjištění závislosti intenzity signálu NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na velikosti pH^a ve směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0 byla použita technika DCV. Látka v této oblasti pH^a poskytovala jeden signál. Velikost pH^a směsi vodně-methanolického roztoku se nelišila výrazně od pH vodného roztoku. Pro lepší přehled jsou naměřené voltametrické křivky rozděleny a znázorněny na Obr. 3.3.1.



Obr. 3.3.1

DC voltamogramy NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) byly měřeny technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1). Čísla nad voltamogramy odpovídají pH roztoku při různých pH.

Jako optimální prostředí z rozmezí hodnot pH^a 2,1 – 12,0 bylo vybráno prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1.

Metodou lineární regrese byla prokázána lineární závislost intenzity signálu NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na velikosti pH^a v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1).

Touto metodou byl vypočten vztah pro závislost potenciálu píku E_p na pH^a roztoku v rozsahu pH^a 2,1 – 12,0:

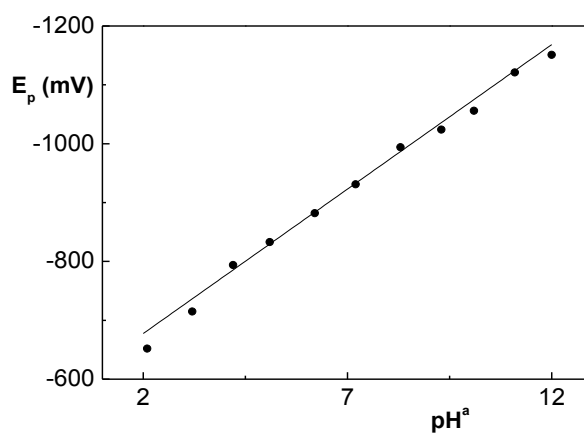
$$E_p(\text{mV}) = -49,081 \text{ pH}^a - 579,427 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9956)$$

Hodnoty E_p a I_p pro měřená pH^a roztoků jsou shrnuty do Tab. 3.3.1 a jejich závislosti zobrazeny na Obr. 3.3.2 a Obr. 3.3.3.

Tab. 3.3.1

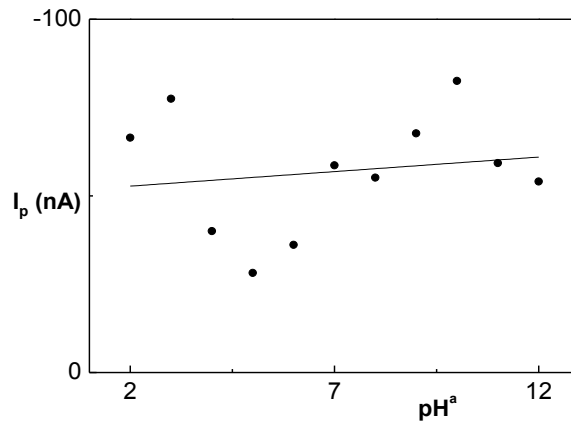
Hodnoty E_p a I_p roztoků NDZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) byly měřeny v prostředích o různých pH^a na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) při různých měřeních.

Prostředí	pH^a	E_p (mV)	I_p (nA)
směs BR pufru pH 2,0 a methanolu (9:1)	2,1	-652	-66,5
směs BR pufru pH 3,0 a methanolu (9:1)	3,2	-715	-77,4
směs BR pufru pH 4,0 a methanolu (9:1)	4,2	-794	-40
směs BR pufru pH 5,0 a methanolu (9:1)	5,1	-833	-28,2
směs BR pufru pH 6,0 a methanolu (9:1)	6,2	-882	-36,2
směs BR pufru pH 7,0 a methanolu (9:1)	7,2	-931	-58,6
směs BR pufru pH 8,0 a methanolu (9:1)	8,3	-994	-55,1
směs BR pufru pH 9,0 a methanolu (9:1)	9,3	-1024	-67,6
směs BR pufru pH 10,0 a methanolu (9:1)	10,1	-1076	-85,2
směs BR pufru pH 11,0 a methanolu (9:1)	11,1	-1124	-59,9
směs BR pufru pH 12,0 a methanolu (9:1)	12,0	-1151	-54,4



Obr. 3.3.2

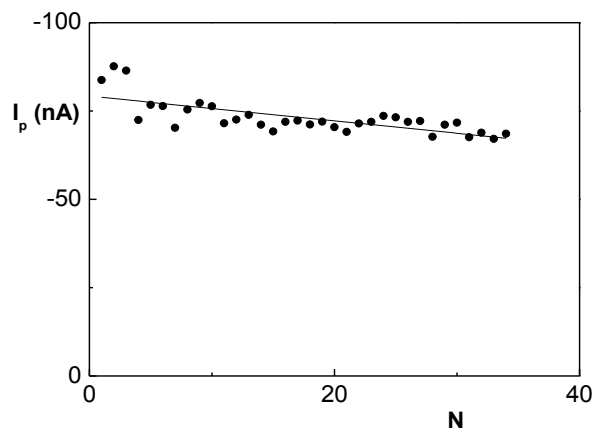
Závislost potenciálu vlny E_p NDZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^a roztoku byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0.



Obr. 3.3.3

Závislost proudu vlny I_p NDZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^a roztoku byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0.

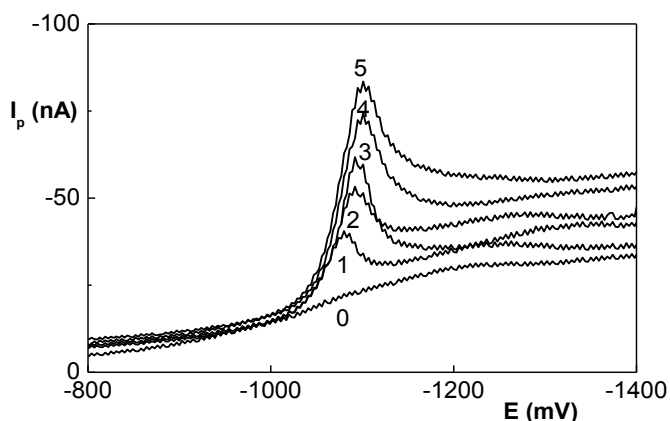
Závislost stability signálu NDZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na opakovaném měření v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1 je zobrazena na Obr. 3.3.4. Z tohoto obrázku je patrný pokles signálu (RSD = 6,6 % pro 34 měření).



Obr. 3.3.4

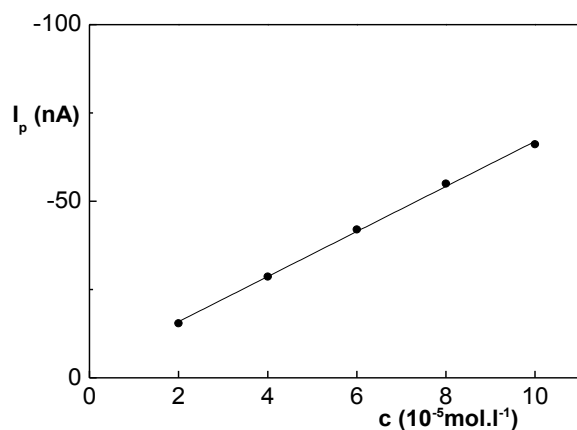
Závislost stability signálu NDZ ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na opakovaném měření byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1 (RSD = 6,6 % pro 34 měření). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV.

Koncentrační závislost NDZ byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1 s vkládanými regeneračními pulzy. Byly měřeny následující koncentrační rozsahy NDZ v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a $(4 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Nižší koncentrace nebyly měřeny kvůli obtížnému vyhodnocení DC voltametrické vlny NDZ. Koncentrační závislost NDZ o koncentraci $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a související závislost I_p na koncentraci NDZ jsou zobrazeny na Obr. 3.3.5 a Obr. 3.3.6. Koncentrační závislost NDZ o koncentraci $(4 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a související závislost I_p na koncentraci NDZ jsou zobrazeny na Obr. 3.3.7 a Obr. 3.3.8. Parametry kalibrační přímky pro stanovení NDZ metodou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a 10,1 jsou shrnuty do Tab. 3.3.2.



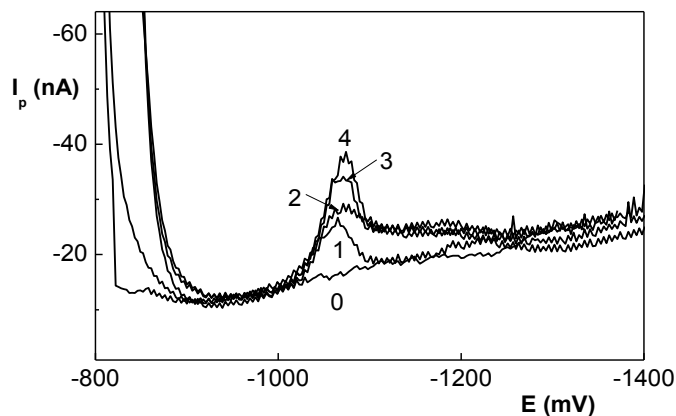
Obr. 3.3.5

DC voltamogramy NDZ byly měřeny technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Koncentrace (NDZ): 0 (0), $2 \cdot 10^{-5}$ (1), $4 \cdot 10^{-5}$ (2), $6 \cdot 10^{-5}$ (3), $8 \cdot 10^{-5}$ (4), $10 \cdot 10^{-5}$ (5) mol.l^{-1} . Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV.



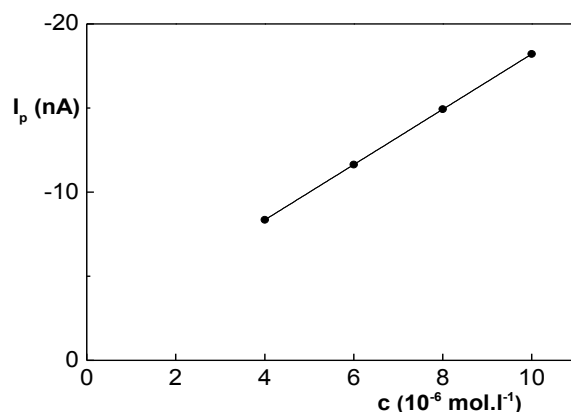
Obr. 3.3.6

Závislost proudu píku I_p na koncentraci NDZ v rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 10 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV .



Obr. 3.3.7

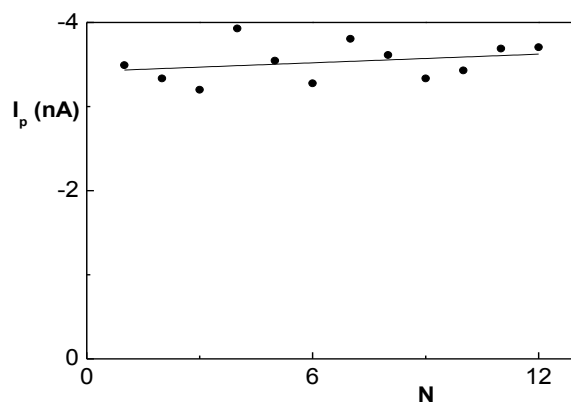
DC voltamogramy NDZ byly měřeny technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Koncentrace (NDZ): 0 (0), $4 \cdot 10^{-6}$ (1), $6 \cdot 10^{-6}$ (2), $8 \cdot 10^{-6}$ (3), $10 \cdot 10^{-6}$ (4) mol.l^{-1} . Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV .



Obr. 3.3.8

Závislost proudu píku I_p na koncentraci NDZ v rozmezí $4 \cdot 10^{-6} - 10 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV .

Mez stanovitelnosti byla vypočtena z 12 měření NDZ ($c = 3 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) a je zobrazena na Obr. 3.3.9. RSD z těchto měření byla 9,9 %, čemuž odpovídá mez stanovitelnosti $5,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$.



Obr. 3.3.9

Závislost I_p NDZ na opakovaných měřeních byla měřena technikou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Měřená koncentrace NDZ byla $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV .

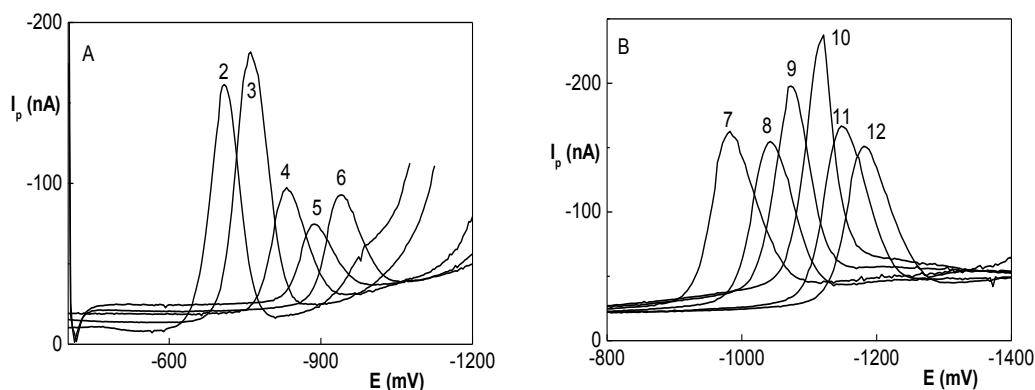
Tab. 3.3.2

Parametry kalibrační přímky pro stanovení NDZ metodou DCV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV.

c [mol.l ⁻¹]	Směrnice [nA.mol ⁻¹ .l]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	LOQ [mol.l ⁻¹]
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	-6,4	-1,772	0,9984	-
$(4 - 10) \cdot 10^{-6}$	-5,58	-1,664	0,9986	$5,5 \cdot 10^{-6}$

3.4 Voltametrické stanovení nordiazepamu na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě pomocí DP voltametrie

Ke zjištění závislosti intenzity signálu NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹) na velikosti pH^a v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0 byla použita technika DPV. Látka v této oblasti pH^a poskytovala jeden signál. Velikost pH^a směsi vodně-methanolického roztoku se nelišila výrazně od pH vodného roztoku. Naměřené voltametrické křivky jsou rozděleny a znázorněny na Obr. 3.4.1.



Obr. 3.4.1

DP voltamogramy NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹) byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1). Čísla nad voltamogramy odpovídají pH roztoku při různých pH.

Jako optimální prostředí z rozmezí hodnot pH^a 2,1 – 12,0 bylo vybráno prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1.

Metodou lineární regrese byla prokázána lineární závislost intenzity signálu NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na velikosti pH^a v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1).

Touto metodou byl vypočten vztah pro závislost potenciálu píku E_p na pH^a roztoku v rozsahu pH^a 2,1 – 12,0:

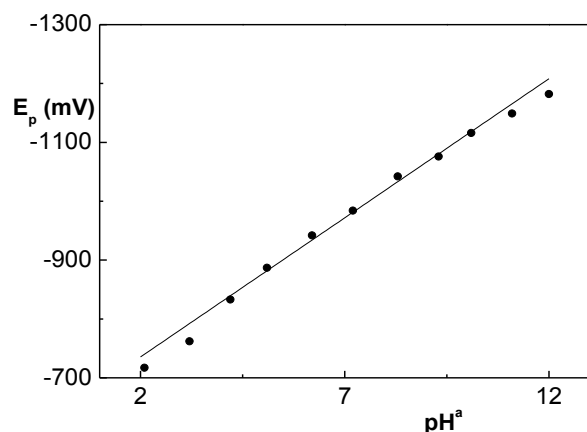
$$E_p(\text{mV}) = -47,273 \text{ pH}^a - 640,91 \quad (\text{korelační koeficient } 0,9988)$$

Hodnoty E_p a I_p pro měřená pH^a roztoků jsou shrnuty v Tab. 3.4.1 a jejich závislosti zobrazeny na Obr. 3.4.2 a Obr. 3.4.3.

Tab. 3.4.1

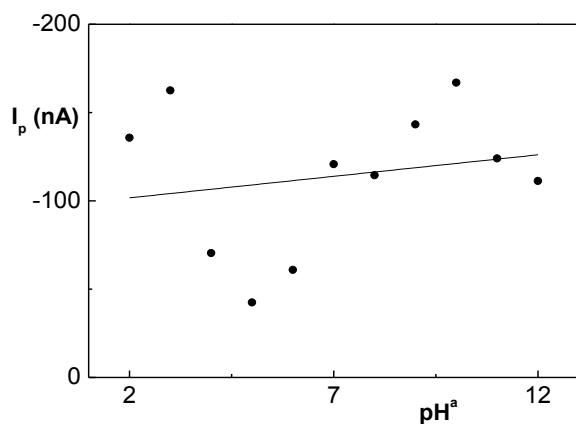
Hodnoty E_p a I_p roztoků NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) byly měřeny v prostředích o různých pH^a na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) při různých měřeních.

Prostředí	pH^a	E_p (mV)	I_p (nA)
směs BR pufru pH 2,0 a methanolu (9:1)	2,1	-717	-135,7
směs BR pufru pH 3,0 a methanolu (9:1)	3,2	-762	-164,5
směs BR pufru pH 4,0 a methanolu (9:1)	4,2	-833	-70,4
směs BR pufru pH 5,0 a methanolu (9:1)	5,1	-942	-42,4
směs BR pufru pH 6,0 a methanolu (9:1)	6,2	-984	-60,9
směs BR pufru pH 7,0 a methanolu (9:1)	7,2	-931	-120,8
směs BR pufru pH 8,0 a methanolu (9:1)	8,3	-1042	-114,5
směs BR pufru pH 9,0 a methanolu (9:1)	9,3	-1076	-143,5
směs BR pufru pH 10,0 a methanolu (9:1)	10,1	-1096	-166,9
směs BR pufru pH 11,0 a methanolu (9:1)	11,1	-1139	-124
směs BR pufru pH 12,0 a methanolu (9:1)	12,0	-1182	-111,2



Obr. 3.4.2

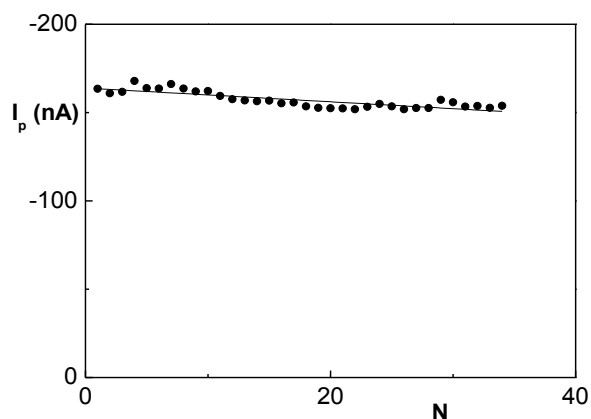
Závislost potenciálu vlny E_p NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^a roztoku byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0.



Obr. 3.4.3

Závislost proudu vlny I_p NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na pH^a roztoku byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH^a hodnot 2,1 – 12,0.

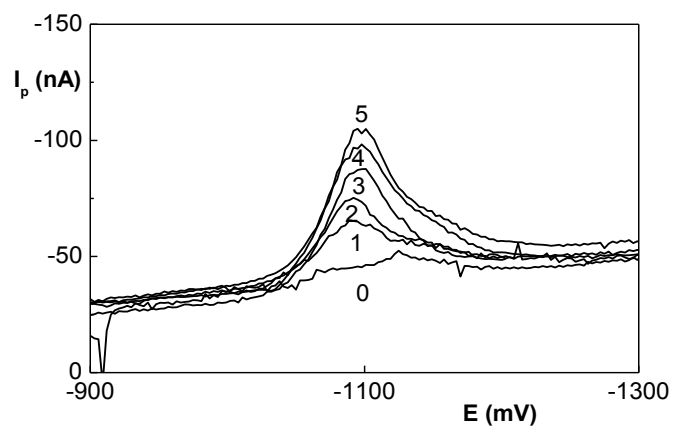
Závislost stability signálu NDZ na opakovaném měření v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1 je zobrazena na Obr. 3.4.4. Z tohoto obrázku je patrná stabilita signálu (RSD = 3 % pro 34 měření).



Obr. 3.4.4

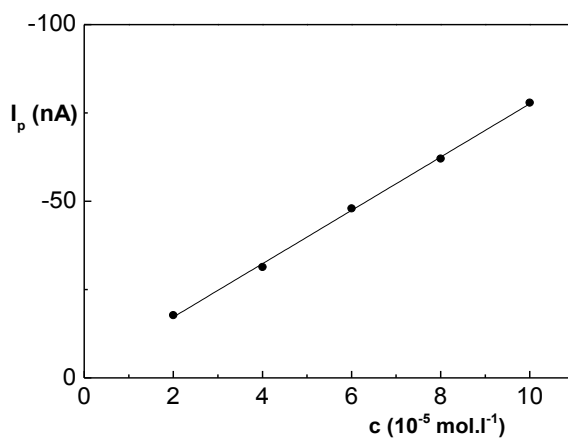
Závislost stability signálu NDZ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) na opakovaném měření byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. (RSD = 3 % pro 34 měření). Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV.

Koncentrační závislost NDZ byla měřena pomocí techniky DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Byly měřeny koncentrační závislosti v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a $(2 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Nižší koncentrace nebyly měřeny kvůli obtížnému vyhodnocení DP voltametrické vlny NDZ. Koncentrační závislosti NDZ o koncentraci $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ a související závislost I_p na koncentraci NDZ je zobrazena na Obr. 3.4.5 a Obr. 3.4.6. Koncentrační závislost NDZ o koncentraci $(2 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a související závislost I_p na koncentraci NDZ je zobrazena na Obr. 3.4.7 a Obr. 3.4.8. Parametry kalibrační přímky pro stanovení NDZ metodou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a 10,1 jsou shrnuty do Tab. 3.4.2.



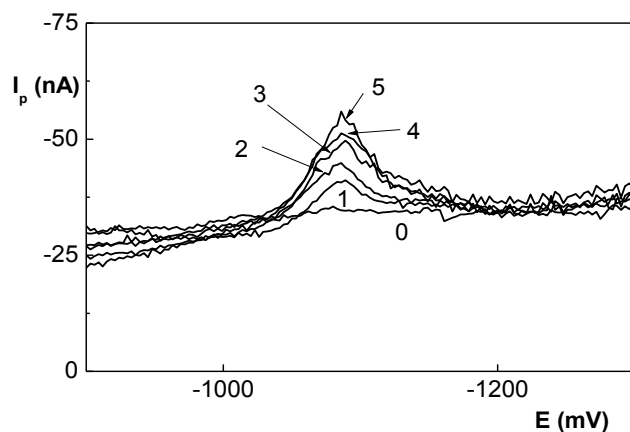
Obr. 3.4.5

DP voltamogramy NDZ byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu o pH^a o hodnotě 10,1. Koncentrace (NDZ): 0 (0), $2 \cdot 10^{-5}$ (1), $4 \cdot 10^{-5}$ (2), $6 \cdot 10^{-5}$ (3), $8 \cdot 10^{-5}$ (4), $10 \cdot 10^{-5}$ (5) mol.l⁻¹. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV.



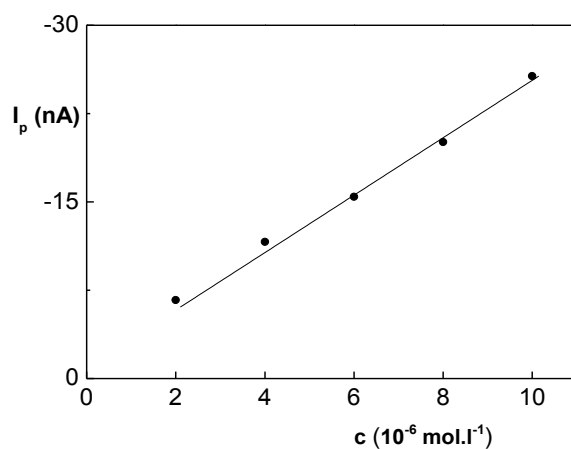
Obr. 3.4.6

Závislost proudu vlny I_p na koncentraci NDZ v rozmezí $2 \cdot 10^{-5}$ – $10 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹ byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV.



Obr. 3.4.7

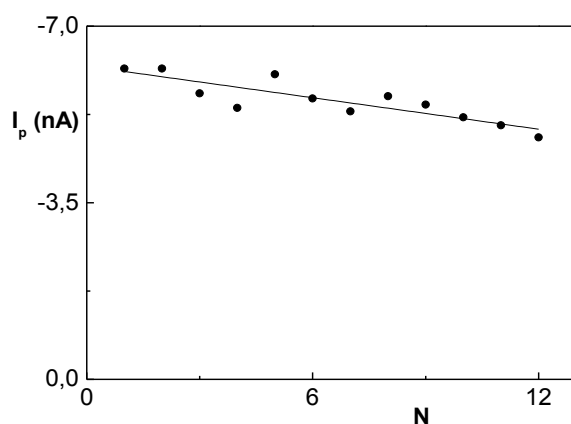
DP voltamogramy NDZ byly měřeny technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Koncentrace (NDZ): 0 (0), $2 \cdot 10^{-6}$ (1), $4 \cdot 10^{-6}$ (2), $6 \cdot 10^{-6}$ (3), $8 \cdot 10^{-6}$ (4), $10 \cdot 10^{-6}$ (5) mol.l^{-1} . Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV.



Obr. 3.4.8

Závislost proudu píku I_p na koncentraci NDZ v rozmezí $2 \cdot 10^{-6}$ – $10 \cdot 10^{-6}$ mol.l^{-1} byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV.

Mez stanovitelnosti byla vypočtena z opakovaných měření při koncentraci NDZ $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a je zobrazena na Obr. 3.4.9. RSD z těchto 12 měření byla 8,8 %, čemuž odpovídá mez stanovitelnosti $1,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Nižší koncentrace nebyly měřeny.



Obr. 3.4.9

Závislost I_p NDZ na opakovaných měřeních byla měřena technikou DPV na m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Měřená koncentrace NDZ byla $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV .

Tab. 3.4.2

Parametry kalibrační přímky pro stanovení NDZ metodou DPV m-AgSAE v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Regenerace elektrody byla prováděna při potenciálech -800 až -1400 mV .

c [mol.l^{-1}]	Směrnice [$\text{nA.mol}^{-1}.\text{l}$]	Úsek [nA]	Korelační koeficient	LOQ [mol.l^{-1}]
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	-7,52	-0,75	0,9963	-
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	-4,28	-0,81	0,9981	$1,7 \cdot 10^{-6}$

4. Závěr

1. Byly vypracovány metody stanovení DZ
 - Technikou DCV na m-AgSAE v koncentračním rozsahu $10 \cdot 10^{-5} - 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Mez stanovitelnosti byla vypočtena na hodnotu $6,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$.
 - Technikou DPV na m-AgSAE v koncentračním rozsahu $10 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2. Mez stanovitelnosti byla vypočtena na hodnotu $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$.
2. Byly vypracovány metody pro stanovení NDZ:
 - Technikou DCV na m-AgSAE v koncentračním rozsahu $10 \cdot 10^{-5} - 4 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Mez stanovitelnosti byla vypočtena na hodnotu $5,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$.
 - Technikou DPV na m-AgSAE v koncentračním rozsahu $10 \cdot 10^{-5}$ až $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí směsi BR pufru a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 10,1. Mez stanovitelnosti byla vypočtena na hodnotu $1,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$.
3. Byla stanovena koncentrace DZ v léčivu:

Koncentrace diazepamu byla stanovena pomocí metody standardního přídatku a citlivější metody DPV v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2 a v prostředí směsi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH a pitné vody (9:1) o pH^a o hodnotě 7,2. Dosažené výsledky jsou shrnuty v Tab. 5.1.

Tab. 5.1

Výsledky analýzy DZ (2 mg) v léčivu měřené metodou DPV pomocí metody standardního přídávku v prostředí směsi 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a methanolu (9:1) o pH^a o hodnotě 13,2 a v prostředí směsi 0,1 mol.l⁻¹ NaOH a pitné vody (9:1) o pH^a o hodnotě 7,2.

Prostředí	Teoretická koncentrace (mol.l ⁻¹)	Změřená koncentrace (mol.l ⁻¹)	Výtěžek (%)
NaOH + methanol	2,8.10 ⁻⁵	1,66.10 ⁻⁵	59,3
NaOH + pitná voda		1,88.10 ⁻⁵	67,1

Nízké hodnoty výtěžnosti při analýze DZ v léčivu metodou DPV mohly být způsobeny menší hmotností deklarované látky v tabletě, nebo adsorbovanými látkami na povrchu elektrody.

Analýza léčiva NDZ nebyla prováděna. Dle zdrojů Státního ústavu pro kontrolu léčiv není toto léčivo na seznamu léčebných přípravků, a tudíž není lékaři v ČR předepisováno. V některých zemích Evropské unie je výdej tohoto léčiva vázán na lékařský předpis.

5. Literatura

- [1] GERECKE, M. Structure and properties of midazolam compared with other benzodiazepins. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1991, vol. 38, p. 154–171.
- [2] VARDANYAN, R., HRUBY, V. *Synthesis of Essential Drugs*. 1st ed. 2006. ISBN 978-0444521668.
- [3] EAGLESON, M. *Concise Encyclopedia Chemistry*. 1st ed. 1994. ISBN 978-0899254579.
- [4] *Remedia Compendium*. 3rd ed. Praha 2: Panax, 1999. 772 p. ISBN 80-902126-5-4.
- [5] SZARA, S. I., LUDFORD, J. P. *Benzodiazepines: A review of research results*. 1981.
- [6] MUSIL, J., NOVÁKOVÁ, O., KUNZ, K. *Biochemie v obrazech a schématech*. 1st ed. Praha 1: Avicenum, 1976. 368 p.
- [7] *Principles of forensic toxicology*. LEVINE, B. (ed.). 2nd ed. 2003. ISBN 978-1890883874.
- [8] *Substance Abuse: A Comprehensive Textbook*. LOWINSON, J. H., RUIZ, P., MILLMAN, R. B., LANGROD, J. G. (Eds.). 4th ed. 2004. ISBN 978-0781734745.
- [9] PÉTURSSON, H. The benzodiazepine withdrawal syndrome and its management. *J R Coll Gen Pract*, 2006, vol. 89, p. 1455–1459. DOI: 10.1111/j.1360-0443.1994.tb03743.x.

- [10] AYD, F. J. *Lexicon of Psychiatry, Neurology, and the Neurosciences*. 1995. ISBN 978-0683002980.
- [11] SALAMONE, S. J. *Benzodiazepines and GHB: Detection and Pharmacology*. 1st ed. Humana Press, 2001. ISBN 978-0896039810.
- [12] SCHATZBERG, A. F., NEMEROFF, C. B. *Essentials of Clinical Psychopharmacology*. 2nd ed. 2006. ISBN 978-1585620173.
- [13] MARTIN, A., SCAHILL, L., CHARNEY, D. S., LECKMAN, J. F. *Pediatric Psychopharmacology: Principles and Practice*. 1st ed. 2002. ISBN 978-0195141733.
- [14] GOLDFRANK, L., FLOMENBAUM, N., LEWIN, N., HOWLAND, M. A., HOFFMAN, R., NELSON, L. *Goldfrank's toxicologic emergencies*. 7th ed. McGraw-Hill Professional, 1998. ISBN 978-0071360012.
- [15] MARLAND, A., SARKAR, P., LEAVITT, R. The Urinary Elimination Profiles of Diazepam and Its Metabolites, Nordiazepam, Temazepam, and Oxazepam, in the Equine after a 10-mg Intramuscular Dose. *J. Anal. Toxicol.*, 1999, vol. 23, p. 29–34.
- [16] DESCOTES, J. *Human Toxicology*. 1st ed. Elsevier Science, 1996. ISBN 978-0444815576.
- [17] *Benzodiazepines*. TRIMBLE, M., HINDMARCH, I. (Eds.). 1st ed. Routledge, 2001. ISBN 978-1871816433.
- [18] AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Benzodiazepine Dependence, Toxicity and Abuse*. 1990. ISBN 978-0890422281.

- [19] LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. 15th ed. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0836-1.
- [20] FOLSCH, U. R., KOCHSIEK, K., SCHMIDT, R. F. *Patologická fyziologie*. 1st ed. Praha: Grada, 2003. ISBN 08-247-0319-X.
- [21] SANTOS, M. M. C., FAMILA, V., GONCALVES, M. L. S. Copper-Psychoactive Drug Complexes: A voltammetric Approach to Complexation by 1,4-Benzodiazepines. *Anal. Biochem.*, 2002, vol. 303, p. 111–119.
- [22] CARVALHO, L. M., CORREIA, D., GARCIA, S. C., BAIROS, A. V., NASCIMENTO, P. C., BOHRER, D. A new method for the simultaneous determination of 1,4-benzodiazepines and amfepramone as adulterants in phytotherapeutic formulations by voltammetry. *Forensic Sci Int.*, 2010, vol. 202, p. 75–81.
- [23] FISCHER, J., VANOURKOVA, L., DANHEL, A., VYSKOCIL, V., CIZEK, K., BAREK, J., PECKOVA, K., YOSYPCHUK, B., NAVRATIL, T. Voltammetric Determination of Nitrophenols at a Silver Solid Amalgam Electrode. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2007, p. 226–234.
- [24] SANTOS, M. M. C., FAMILA, V., GONCALVES, M. L. S. Square-wave voltammetric techniques for determination of psychoactive 1,4-benzodiazepine drug. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, vol. 374, p. 1074–1081.
- [25] CHAVES, M. E. L., SANTANDER, J. M. P., AGUILERA, A. M. C., RODRÍGUEZ, R. N., DE CISNERO, J. L. H. Modified carbon-paste electrodes as sensors for the determination of 1,4-benzodiazepines: Application to the determination of diazepam and oxazepam in biological fluids. *Sens. Actuators, B*, 2006, vol. 115, p. 575–583.

- [26] RIBARSKA, J. T., JOLEVSKA, S. T., MILENKOVA, K., GORAČINOVA, K., DODOV, M. G., DIMITROVSKA, A. Simultaneous determination of diazepam and Preservatives in HPMC hydrogel by HPLC. *Bull. Chem. Technol. Macedonia*, 2005, vol. 24, p. 103–108.
- [27] GIER, J. J., THART, B. J. Sensitive determination of diazepam and N-desmethyldiazepam in plasma. *J. Chromatogr.*, 1979, vol. 163, p. 304–309.
- [28] HAWARY, W. F., ISSA, Y. M., TALAT, A. Spectrophotometric Determination of Diazepam in Pure form, Tablets and Ampoules. *Int. J. Biomed. Sci.*, 2007, vol. 3, p. 50–55.
- [29] TISCIONE, N. B., SHAN, X., ALFORD, I., YEATMAN, D. T. Quantitation of Benzodiazepines in Whole Blood by Electron Impact-Gas Chromatography – Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, 2008, vol. 32, p. 644–652.
- [30] WEINFELD, E. R., POSMANTER, H. N., KHOO, K. C., PUGLISI, C. V. Rapid determination of diazepam and nordiazepam in plasma by electron capture gas-liquid chromatography : Application in clinical pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr.*, 1977, vol. 143, p. 581–595.
- [31] HUANG, W., MOODYT, D. E., ANDRENYAK, D. M., ROLLINS, D. E. Immunoassay detection of nordiazepam, triazolam, lorazepam, and alprazolam in blood. *J. Anal. Toxicol.*, 1993, vol. 17, p. 365–369.
- [32] CABALKOVÁ, D., BAREK, J., FISCHER, J., NAVRÁTIL, T., PECKOVÁ, K., YOSYPCHUK, B. Voltametrické stanovení herbicidu bifenoxu na stříbrné pevné amalgámové elektrodě modifikovanou rtuťovým meniskem. *Chem. Listy*, 2003, vol. 103, p. 236–242.