

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

**Studium elektrochemických vlastností borem dopovaných diamantových
elektrod a jejich aplikace při analýze bioaktivních látek**

Ing. Michaela Štěpánková

Disertační práce
2018

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

**Electrochemical properties of boron-doped diamond electrodes and their
application in analysis of bioactive compounds**

Ing. Michaela Štěpánková

Ph.D. Thesis
2018

Prohlášení autora

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne:

Podpis: Michaela Štěpánková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své rodině a mému příteli Michalovi, kteří mi byli ve studiu oporou a podporovali mě během sepisování této disertační práce.

Dále bych ráda poděkovala své vedoucí disertační práce doc. Ing. Renátě Šelešovské, Ph.D. za odborné vedení během celého doktorského studia.

SOUHRN

V této disertační práci byly zkoumány fyzikální, chemické a elektrochemické vlastnosti laboratorně připravovaných borem dopovaných diamantových elektrod (BDDE) s různým obsahem boru. Pro charakterizaci BDD filmů byla použita skenovací elektronová mikroskopie a Ramanova spektroskopie. Elektrochemické vlastnosti testovaných elektrod byly studovány s využitím cyklické voltametrie a elektrochemické impedanční spektroskopie reverzibilních systémů $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$. Pro testování aplikačních možností BDDE s různým obsahem boru byl použit herbicid linuron, léčiva mesalazin a leukovorin. S využitím komerčně dostupné BDDE byly vyvinuty metody pro stanovení těchto biologicky aktivních látek, které byly poté aplikovány při jejich stanovení s využitím testovaných BDDE. Cílem bylo získání základních statistických parametrů a jejich porovnání v souvislosti s obsahem boru v materiálu elektrod.

Klíčová slova: Voltametrie, borem dopovaná diamantová elektroda, obsah boru, povrchová charakterizace, elektrochemické vlastnosti, linuron, mesalazin, leukovorin

SUMMARY

In this Ph.D. thesis, physical, chemical, and electrochemical properties of lab-made boron-doped diamond electrodes (BDDE) with different boron content have been investigated. Scanning electron microscopy and Raman spectroscopy were used for characterization of BDD films. Electrochemical properties of the tested electrodes were studied by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy of reversible redox markers $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ and $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$. Applicability of the tested working electrodes was examined employing three various bioactive compounds – herbicide linuron, drugs mesalazine and leucovorin. Analytical methods for the determination of these analytes were developed at first using commercially available BDDE. The proposed methods were subsequently applied to the analytes determination using the investigated working electrodes. The aim was to obtain basic statistical parameters and compare them considering the different content of boron in material of the tested electrodes.

Key words: Voltammetry, boron-doped diamond electrode, boron content, surface characterization, electrochemical properties, linuron, mesalazine, leucovorin

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	10
Úvod	13
1 Teoretická část	16
1.1 Pracovní elektrody ve voltametrii	16
1.1.1 Rtuťové elektrody	16
1.1.2 Pevné elektrody	17
1.1.2.1 Amalgámové elektrody	18
1.1.2.2 Bismutové elektrody	20
1.1.2.3 Uhlíkové pastové elektrody	22
1.1.2.4 Kompozitní elektrody	22
1.1.2.5 Tištěné elektrody	22
1.1.2.6 Modifikované elektrody	23
1.2 Borem dopovaná diamantová elektroda	24
1.2.1 Příprava borem dopovaných diamantových elektrod	24
1.2.2 Charakterizace borem dopovaných diamantových elektrod	25
1.2.2.1 Spektrální a mikroskopické metody povrchové charakterizace	26
1.2.2.2 Elektrochemické metody pro studium elektrochemických vlastností	26
1.2.3 Vliv obsahu boru na vlastnosti borem dopovaných diamantových elektrod	29
1.2.4 Aplikace borem dopovaných diamantových elektrod	29
1.3 Studované látky	31
1.3.1 Linuron	31
1.3.1.1 Vlastnosti a význam linuronu	31
1.3.1.2 Voltametrické chování linuronu	32
1.3.2 Mesalazin	34
1.3.2.1 Vlastnosti a význam mesalazinu	34
1.3.2.2 Voltametrické chování mesalazinu	35
1.3.3 Leukovorin	37
1.3.3.1 Vlastnosti a význam leukovorinu	37
1.3.3.2 Voltametrické chování leukovorinu	38
2 Experimentální část	40
2.1 Použité chemikálie	40

2.2	Přístrojové vybavení	40
2.3	Pracovní postupy	42
2.3.1	Příprava BDDE k měření	42
2.3.2	Voltametrická měření	43
2.3.3	Analýza praktických vzorků	44
2.3.4	Zpracování dat a výpočty	45
3	Výsledky a diskuze	47
3.1	Studium voltametrického chování vybraných bioaktivních látek na BDDE a vývoj metod jejich stanovení	47
3.1.1	Linuron	47
3.1.1.1	Studium voltametrického chování linuronu	47
3.1.1.2	Vývoj voltametrické metody stanovení linuronu	50
3.1.2	Mesalazin	57
3.1.2.1	Studium voltametrického chování mesalazinu	57
3.1.2.2	Vývoj voltametrické metody stanovení mesalazinu	60
3.1.3	Leukovorin	65
3.1.3.1	Studium voltametrického chování leukovorinu	65
3.1.3.2	Vývoj voltametrické metody stanovení leukovorinu	67
3.1.4	Shrnutí základních parametrů navržených metod	72
3.2	Charakterizace borem dopovaných diamantových elektrod s různým obsahem boru ..	74
3.2.1	Skenovací elektronová mikroskopie	74
3.2.2	Ramanova spektroskopie	76
3.2.3	Elektrochemická impedanční spektroskopie	77
3.2.4	Cyklická voltametrie s využitím $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$	78
3.2.5	Cyklická voltametrie s využitím $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$	85
3.3	Aplikační možnosti BDDE s různým obsahem boru při analýze vybraných látek	90
3.3.1	Výška proudového signálu v závislosti na obsahu boru	90
3.3.2	Analytické parametry stanovené z koncentračních závislostí	91
3.3.2.1	Statistické parametry pro linuron	91
3.3.2.2	Statistické parametry pro mesalazin	93
3.3.2.3	Statistické parametry pro leukovorin	95
3.3.3	Opakované stanovení analytů v modelových roztocích	98
4	Závěr	101

Seznam použité literatury	103
Příloha 1.....	115
Přehled publikační činnosti autorky	115
Příloha 2.....	119
Separáty publikací v časopisech s IF související s tématem disertační práce	119

Seznam zkratk a symbolů

<i>A</i>	amplituda [V]
<i>A</i>	elektroaktivní plocha elektrody [mm ²]
AdSV	Adsorptivní rozpouštěcí voltametrie (adsorptive stripping voltammetry)
AdS DPV	Adsorptivní rozpouštěcí diferenčně pulzní voltametrie (adsorptive stripping differential pulse voltammetry)
AdS SWV	Adsorptivní rozpouštěcí square wave voltametrie (adsorptive stripping square wave voltammetry)
AFM	mikroskopie atomárních sil (atomic force microscopy)
AgSAE	stříbrná pevná amalgámová elektroda (silver solid amalgam electrode)
BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda (boron-doped diamond electrode)
BiBE	bismutová disková elektroda (bismuth bulk electrode)
Bi-CPE	uhlíková pastová elektroda modifikovaná bismutem (bismuth modified carbon paste electrode)
BiFE	bismutová filmová elektroda (bismuth film electrode)
BRB	Brittonův-Robinsonův pufr (Britton-Robinson buffer)
<i>c</i>	koncentrace [mol L ⁻¹]
C _{Ag} AE	krystalová stříbrná amalgámová elektroda (crystal silver amalgam electrode)
CNT/GCE	uhlíkovými nanotrubicemi modifikovaná skleněná uhlíková elektroda (carbon nanotubes modified glassy carbon electrode)
CPE	uhlíková pastová elektroda (carbon paste electrode)
CuSAE	měděná pevná amalgámová elektroda (copper solid amalgam electrode)
CV	cyklická voltametrie (cyclic voltammetry)
<i>D</i>	difuzní koeficient [cm ² s ⁻¹]
DAE	dentální amalgámová elektroda (dental amalgam electrode)
DCV	stejnoseměrná voltametrie (direct current voltammetry)
DME	kapající rtuťová elektroda (dropping mercury electrode)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DPV	diferenční pulzní voltametrie (differential pulse voltammetry)
<i>E</i>	potenciál [V]
<i>E</i> ⁰	standardní elektrodový potenciál [V]
<i>E</i> _a	anodický potenciál [V]
EIS	elektrochemická impedační spektroskopie (electrochemical impedance spectroscopy)
<i>E</i> _k	katodický potenciál [V]
<i>E</i> _{kon}	konečný potenciál [V]
<i>E</i> _{obratu}	potenciál obratu [V]
<i>E</i> _p	potenciál píku [V]
EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí (Environmental Protection Agency)
<i>E</i> _{poč}	počáteční potenciál [V]
<i>f</i>	frekvence [Hz]

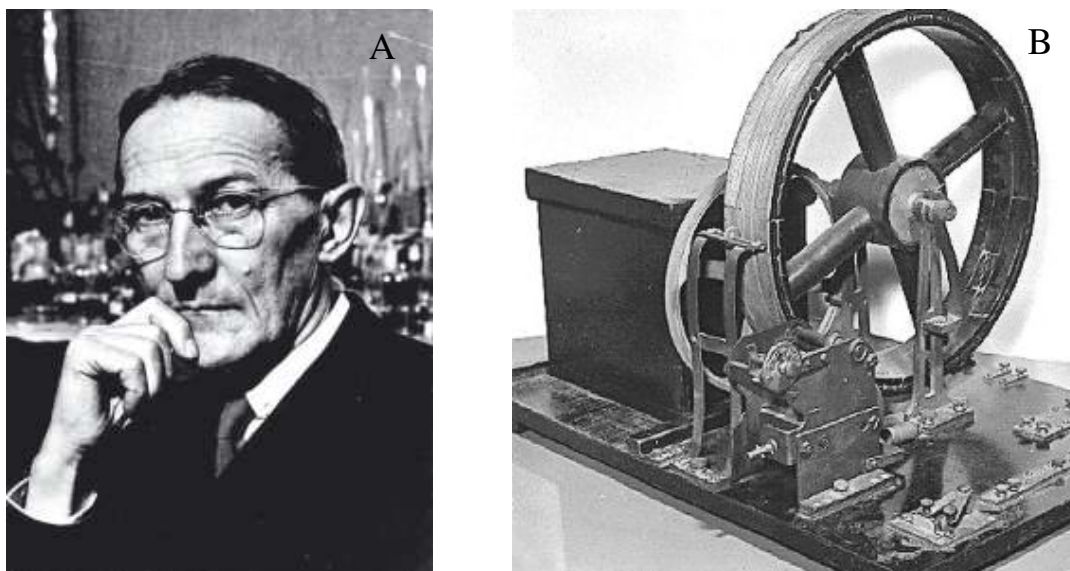
F	Faradayova konstanta [C]
GCB	borem dopovaná elektroda ze skleného uhlíku (boron-doped glassy carbon electrode)
GCE	elektroda ze skelného uhlíku (glassy carbon electrode)
HF CVD	chemická depozice par s využitím žhaveného vlákna (hot filament chemical vapor deposition)
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda (hanging mercury drop electrode)
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International agency for research on cancer)
I_p	proud píku [A]
I_{pa}	proud anodického píku [A]
I_{pc}	proud katodického píku [A]
k_{app}^0	zdánlivá rychlostní konstanta přenosu náboje [cm s^{-1}]
LDR	lineární dynamický rozsah
LD50	letální dávka, která vede k úmrtí poloviny testovaných organismů (lethal dose)
LV	leukovorin
LIN	linuron
LOD	limit detekce (limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (limit of quantification)
LSV	stejnoseměrná voltametrie s rychlým skenem (linear sweep voltammetry)
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda (mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode)
Me	kov tvořící amalgám (metal)
MeA-PE	pastová amalgámová elektroda bez pastovací kapaliny (metal amalgam paste electrode)
MeSA-CE	kompozitní amalgámová elektroda (metal solid amalgam composite electrode)
MeSAE	pevná amalgámová elektroda (metal solid amalgam electrode)
MeSA-PE	pastová amalgámová elektroda s pastovací kapalinou (metal solid amalgam paste electrode)
MF-MeSAE	rtuťovým filmem modifikovaná pevná amalgámová elektroda (mercury film modified metal solid amalgam electrode)
m-MeSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná pevná amalgámová elektroda (mercury meniscus modified metal solid amalgam electrode)
MP CVD	chemická depozice par s využitím mikrovlnného plazmatu (microwave plasma chemical vapor deposition)
MTX	metotrexát
MWCNTs/GCE	vícetěnnými uhlíkovými nanotrubicemi modifikovaná elektroda ze skelného uhlíku (multi-wall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode)
n	počet vyměněných elektronů
PABSA/Q-MWNTs/GCE	vícetěnnými uhlíkovými nanotrubicemi modifikovaná elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná aminobenzen sulfonovou

	kyselinou (<i>p</i> -aminobenzene sulfonic acid on quaternary amine functionalized multi-wall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode)
PE	polyethylen
<i>p</i> -MeSAE	leštěná pevná amalgámová elektroda (polished metal solid amalgam electrode)
PPY	polypyrol (polypyrrole)
PtNP-BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda modifikovaná platinovými nanočásticemi (boron-doped diamond electrode modified with platinum nanoparticles)
<i>r</i>	korelační koeficient
<i>R</i>	odpor [Ω]
RSD _M (11)	relativní směrodatná odchylka opakovaného měření (11 opakovaných křivek) [%]
RSD _S (5)	relativní směrodatná odchylka opakovaného stanovení (5 opakovaných stanovení) [%]
SEM	skenovací elektronová mikroskopie (scanning electron microscopy)
SWV	square wave voltametrie
<i>T</i>	teplota [$^{\circ}\text{C}$]
TCP-CPE	uhlíková pastová elektroda obsahující tricresyl fosfát (Tricresyl phosphate-based carbon paste electrode)
<i>v</i>	rychlost polarizace [mV s^{-1}]
<i>V</i>	objem [mL]
5-ASA	5- aminosalicilová kyselina, melasazin (5-aminosalicylic acid, mesalazine)
α	koeficient přenosu náboje
γ	poměr difuzních koeficientů
Ψ	míra reversibility, resp. ireversibility elektrodové reakce

Úvod

Elektrochemické metody patří mezi instrumentální analytické metody hojně využívané při analýze široké škály biologicky významných látek i škodlivých látek v životním prostředí. Mezi známé výhody polarografických a voltametrických metod patří zejména časová a finanční úspornost, jednoduchá instrumentace, snadná miniaturizace a automatizace a vysoká citlivost.

Polarografie, resp. voltametrie má v České republice dlouhou tradici díky Jaroslavu Heyrovskému (obrázek 1A), kterému Švédská akademie věd udělila v roce 1959 Nobelovu cenu za jeho životní dílo – objev a propracování polarografické metody. První poznatky o polarografii uveřejnil Jaroslav Heyrovský již v roce 1922 [1]. Na obrázku 1B je zachycen první polarograf. Základním rozdílem mezi polarografií a voltametrií je použitá pracovní elektroda, kdy v polarografii se používá nestacionární kapající rtuťová elektroda (DME) a ve voltametrii jsou využívány stacionární elektrody, např. visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) a pevné pracovní elektrody [2].



Obrázek 1: Prof. Jaroslav Heyrovský (A) [3] a první polarograf (B) [4].

Pro polarografická, resp. voltametrická měření je charakteristické současné sledování napětí na elektrodách a proudu tekoucího elektrochemickým článkem v souvislosti s chemickými a elektrochemickými reakcemi probíhajícími v článku. Jedna z těchto veličin představuje měřenou (závislou) proměnnou, zatímco druhá veličina je volena a má konstantní hodnotu nebo je plynule měněna [5]. Zapojení obvodu pro voltametrická měření může být

dvouelektrodové nebo tříelektrodové. U dvouelektrodového zapojení je napětí ze zdroje vkládáno na pracovní a referentní elektrodu. Se změnou vloženého napětí se mění pouze potenciál polarizovatelné pracovní elektrody, protože potenciál nepolarizovatelné referentní elektrody je konstantní [6]. V tříelektrodovém zapojení je potenciál pracovní elektrody nastavován vůči referentní elektrodě a proud prochází mezi pracovní a nepolarizovatelnou pomocnou elektrodou [2].

Ve čtyřicátých a padesátých letech patřila polarografie k nejcitlivějším analytickým metodám, široce používaným ke stanovení velkého množství organických i anorganických látek. V šedesátých letech došlo k poklesu významu klasické polarografie, protože její citlivost a selektivita přestaly vyhovovat neustále rostoucím požadavkům praxe. Později v sedmdesátých a osmdesátých letech došlo opět k rozvoji moderních polarografických a zejména voltametrických metod (normální a diferenční pulsní polarografie či voltametrie, anodická rozpouštěcí voltametrie, adsorpční rozpouštěcí voltametrie, atd.). Zavedení nových voltametrických technik umožnilo využití elektroanalytických metod ke stopové analýze organických i anorganických látek [7]. V současnosti je pozornost v této oblasti zaměřena zejména na vývoj senzorů, resp. biosenzorů.

Vedle klasických rtuťových, uhlíkových nebo kovových elektrod se v současnosti vyvíjí a využívají různé nové elektrodové materiály popřípadě modifikace povrchů stávajících elektrod. Nové elektrodové materiály by měly vykazovat nízký šum a zbytkový proud, široké potenciálové okno, odolnost vůči pasivaci, mechanickou stabilitu atd. Důležitá je i jejich slučitelnost s tzv. zelenou analytickou chemií, která požaduje minimální toxicitu elektrodových materiálů.

Předkládaná disertační práce je zaměřena na problematiku testování perspektivních elektrodových materiálů při analýze bioaktivních látek. S ohledem na omezení týkající se rtuťových elektrod byly v rámci doktorského studia testovány pevné amalgámové elektrody a bismutové elektrody. Tyto dva typy elektrod jsou v literatuře nejčastěji zmiňovány jako alternativy k elektrodám rtuťovým, jejichž používání se stává problematickým v souvislosti s toxicitou rtuti, resp. jejích par a organokovových sloučenin, protože vykazují podobné elektrochemické vlastnosti, zejména široké potenciálové okno v katodické oblasti a možnost využití rozpouštěcích technik. K této problematice se vztahují některé publikační výstupy autorky. Vlastní disertační práce byla zaměřena na elektrochemické vlastnosti a praktické využití borem dopované diamantové elektrody, která je unikátní šířkou využitelného potenciálového okna, jenž umožňuje měření v anodické i katodické oblasti a tedy sledování

jak oxidačních, tak redukčních reakcí. Cílem práce bylo studium elektrochemických vlastností uvedených elektrod v závislosti na obsahu boru v diamantovém filmu a vývoj metod stanovení konkrétních bioaktivních látek.

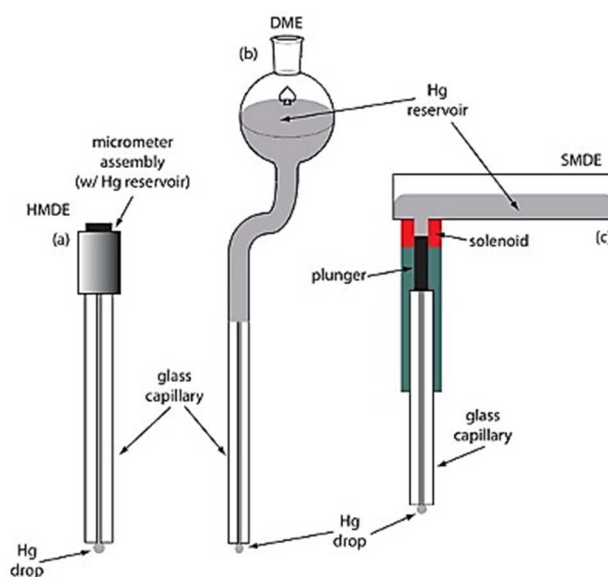
1 Teoretická část

1.1 Pracovní elektrody ve voltametrii

Jak již bylo řečeno v úvodu, polarizovatelné pracovní elektrody bývají buď z tuhých materiálů jako např. uhlíkové, platinové, zlaté apod., nebo rtuťové. Pracovní elektrody mohou mít různou velikost a tvar a jejich výběr závisí především na redoxních vlastnostech studované látky a na využitelném potenciálovém rozsahu elektrody [4]. Tato kapitola představuje stručný přehled pracovních elektrod, které jsou využívány ve voltametrii.

1.1.1 Rtuťové elektrody

V polarografii, voltametrii i dalších příbuzných technikách hrají zásadní roli rtuťové pracovní elektrody. Na obrázku 2 jsou uvedena základní uspořádání těchto elektrod, konkrétně DME, HMDE a statická rtuťová kapková elektroda (SMDE), která se liší zejména intervalem, resp., řízením odkapávání rtuťové kapky. Rtuťové elektrody představují doposud nejlepší nástroj pro stanovení elektrochemicky redukovatelných látek. Rtuť má proti jiným elektrodovým materiálům řadu výhod. Tou hlavní je snadná a reprodukovatelná obnovitelnost povrchu odkápnutím rtuťové kapky a vytvořením nové. Takto vzniklý povrch je dokonale čistý, hladký a neovlivněný předchozími měřeními. Tím se minimalizuje většina problémů souvisejících s pasivací elektrody. Vzhledem k tomu, že rtuť je kapalný kov, geometrický povrch kapky odpovídá skutečnému. Velkou předností rtuťových elektrod je rovněž vysoké přepětí vodíku a tedy široké potenciálové okno v katodické oblasti [9].



Obrázek 2: Rtuťové pracovní elektrody: HMDE (a), DME (b), SMDE (c) [8].

Naopak v anodické oblasti je využití těchto elektrod omezeno oxidací rtuti a nejsou proto vhodné při analýze oxidovatelných látek. Další nevýhodou je špatná mechanická odolnost, což může být problematické při měření s přenosnými analyzátory. Kapkové elektrody nejsou vhodné ani při analýze v průtokových systémech. Hlavní nevýhodou rtuťových elektrod je práce s poměrně velkým množstvím kapalné rtuti. Zejména v posledních letech vzhledem k obavám z její toxicity roste tlak na omezení jejího používání [9]. Objevují se různé ekologické a bezpečnostní předpisy, které zakazují nebo významně komplikují využívání rtuťových elektrod v praxi [10, 11]. V některých zemích bylo jejich použití již zcela zakázáno.

1.1.2 Pevné elektrody

Kromě rtuťových elektrod se ve voltametrické používají také pevné pracovní elektrody (obrázek 3), jejichž povrch je na rozdíl od rtuťových více či méně nehomogenní. Mezi tyto elektrody patří hlavně různé formy uhlíkových elektrod a kovové elektrody (Pt, Au, Ag). Jejich hlavní výhodou je vysoké přepětí kyslíku, které umožňuje sledování oxidačních reakcí i při velmi pozitivních hodnotách potenciálu. Vodíkové přepětí však mívají pevné elektrody v porovnání se rtuťovými nižší. Mezi výhody těchto elektrod patří také chemická a mechanická stabilita, což umožňuje jejich využití při měření v průtoku [12].



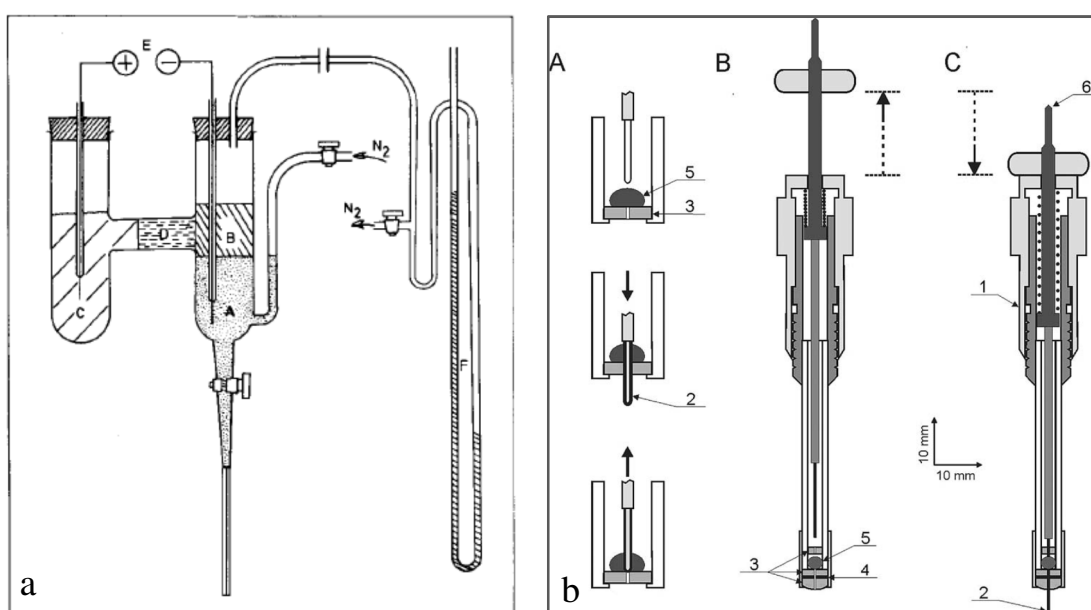
Obrázek 3 Pevné pracovní elektrody [13].

Největší nevýhodou pevných elektrod je problematické obnovování povrchu, které se provádí mechanickým leštěním a broušením nebo zařazením elektrochemické regenerace. V žádném případě ale nelze dosáhnout takové opakovatelnosti povrchu jako v případě rtuťových kapkových elektrod. Může se významně projevit pasivace povrchu a výsledky analýz mohou být ovlivněny předchozími měřeními. Důsledkem pak je i horší opakovatelnost měření či nižší citlivost stanovení. Kromě již zavedených uhlíkových elektrodo

materiálů, jako je např. skelný uhlík, pyrolytický uhlík apod., existují také novější materiály na bázi uhlíku, kterými jsou např. uhlíkové nanotrubičky [14], grafen [15-17], uhlíková nanovlákna [18], retikulární skelný uhlík [19], naprášený nanouhlíkový film [20] nebo uspořádaný mesoporézní uhlík [21]. V následujícím textu bude podrobněji pojednáno o konkrétních hojně využívaných typech pracovních elektrod.

1.1.2.1 Amalgámové elektrody

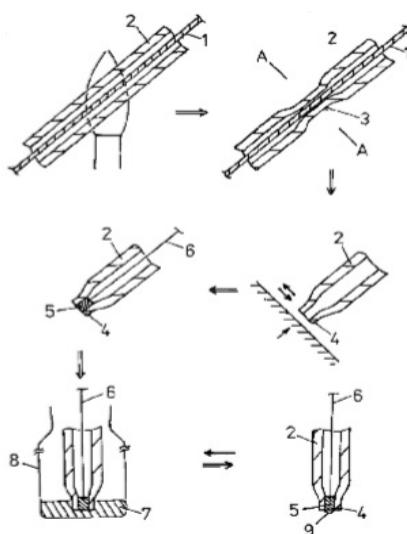
Amalgámové elektrody jsou velmi často zmiňovány v souvislosti s náhradou elektrod rtuťových s ohledem na výše diskutovanou toxicitu rtuti, protože představují jakýsi mezistupeň mezi kovovými a rtuťovými pracovními elektrodami. Vedle v současnosti velmi rozšířených pevných amalgámových elektrod se používají také amalgámové elektrody filmové [22-25] a v minulosti byly rovněž popsány amalgámové kapkové elektrody jako obdoba rtuťových kapkových elektrod [26-30]. Nevýhodou obou těchto typů amalgámových elektrod je zejména složitá konstrukce s pohyblivými součástmi, jak ilustruje obrázek 4.



Obrázek 4: a - Uspořádání visící měděné amalgámové kapkové elektrody [28] (A – měděný amalgám, B – roztok elektrolytu, C – anodový prostor, D – agarová zátka, E – spojení s externím zdrojem, F – manometr), b – Uspořádání filmové amalgámové elektrody [31] (A – obnovování filmu amalgámu na povrchu Ag elektrody, B – mezi měřeními, C – elektroda připravená pro měření; 1 – mikrometrický šroub, 2 – píst s cylindrickou Ag elektrodou na konci, 3 – O-kroužek, 4 – Ag fólie, 5 – kapalný stříbrný amalgám, 6 – elektrický kontakt).

První zmínky o pevných amalgámových elektrodách pochází z roku 2000, kdy vyšly nezávisle na sobě dvě publikace představující tyto pracovní elektrody. První práce autorů Ø.

Mikkelsena a K. H. Schrødera (NTNU – Trondheim, Norwegian University of Science and Technology) vyšla pod názvem „*Dental amalgam in voltammetry (Dentální amalgám ve voltametrii)*“ a uvádí do praxe tzv. dentální amalgámovou elektrodu (DAE) [32]. Druhá z publikací, která vyšla pod názvem „*Pevné stříbrné amalgámové elektrody*“, představuje tzv. pevnou amalgámovou elektrodu (MeSAE – solid amalgam electrode, Me – kov tvořící amalgám (např. Ag, Au, Cu)) a autory jsou L. Novotný a B. Yosypchuk z Fyzikálního ústavu Jaroslava Heyrovského AV ČR v Praze [33]. Zatímco DAE byla v dalších letech autory využívána výhradně pro stanovení kationů různých kovů [34, 35], aplikace MeSAE byla mnohem univerzálnější [36, 37]. Pevné amalgámové elektrody mohou být tvořeny kovy nebo jejich slitinami (Ag, Au, Cu, BiAg, Cr, atd.), které se mohou smáčet rtuť a tvořit s ní pevné amalgámy. Jejich výroba je schematicky znázorněna na obrázku 5. Podle použitého kovu se dělí na dvě hlavní skupiny. Buď je amalgám tvořen kovem méně aktivním než rtuť (Au, Ag, Ir), a pak se vlastnosti elektrody blíží elektrodě rtuťové, nebo je amalgám tvořen kovem elektrochemicky aktivnějším než rtuť (Bi, Cd, Cu), a potom se při analýze obvykle využívá konkrétních interakcí analytu s tímto kovem [38]. Amalgámové elektrody lze rozdělit také podle stavu povrchu nebo použité formy amalgámu na pevnou amalgámovou elektrodu (MeSAE), kterou lze dále využít jako leštěnou (p-MeSAE), rtuťovým filmem modifikovanou (MF-MeSAE) nebo rtuťovým filmem modifikovanou (m-MeSAE) elektrodu. Dalšími popsány typy jsou pastová amalgámová elektroda [39], kompozitní amalgámová elektroda [40] a krystalová stříbrná amalgámová elektroda (CAgAE) [41].



Obrázek 5: Příprava rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrody [42] (1- stříbrný drátek, 2 – skleněná trubička, 3 – vytažená část trubičky, A-A místo přerýznutí, 4 – dolní část trubičky, 5 – prášek kovu, 6 – platinový drátek, 7 – rtuť, 8 – lahvička, 9 – meniskus rtuti).

Největší výhodou amalgámových elektrod je to, že dostupné potenciálové okno je srovnatelné s HMDE. Tyto elektrody jsou proto vhodné zejména pro sledování redukčních reakcí a mohou tedy v mnoha případech nahradit HMDE. Současně vnáší nové, na čistě rtuťových elektrodách neproveditelné možnosti. Mezi další výhody těchto elektrod patří nízký zbytkový proud a šum, prakticky neomezená životnost elektrod, použitelnost v širokém spektru rozpouštědel a základních elektrolytů a fakt, že elektrody vyrobené z pevných amalgámů jsou netoxické. Mohou být použity v terénních analyzátoch, při měření v průtokových systémech i jako součást elektrochemických detektorů. Mezi nevýhody pevných amalgámových elektrod patří horší opakovatelnost měření v porovnání s HMDE související s jejich regenerací [43] a omezené možnosti pro sledování oxidačních procesů kvůli snadnému rozpouštění materiálu elektrody již při nízkých kladných potenciálech [38]. Nejčastěji využívanou variantou pevných amalgámových elektrod je stříbrná pevná amalgámová elektroda (AgSAE) [44]. V literatuře se dále objevují publikace zaměřené také na aplikaci měděné pevné amalgámové elektrody (CuSAE) v oblasti elektroanalytické chemie, kde autoři při analýze obvykle využívají tvorbu komplexů analytu s mědí [45].

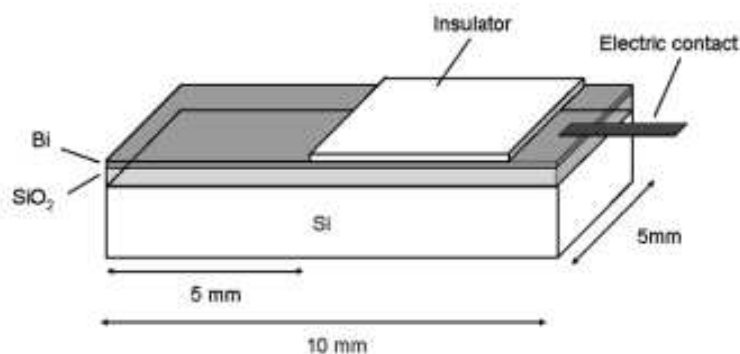
1.1.2.2 Bismutové elektrody

Další z často uváděných alternativ oblíbených rtuťových elektrod představují bismutové elektrody, a to jak v konfiguraci tenkého povlaku bismutu, který je elektrolyticky vyloučený na povrchu nosné elektrody (BiFE, bismuth film electrode), tak v podobě disku z kovového bismutu (BiBE, bismuth bulk electrode), popř. elektrodového materiálu s přimíseným bismutovým práškem (např.: Bi-CPE, bismuth modified carbon paste electrode). V posledních letech se objevují rovněž práce týkající se tzv. naprašovaných bismutových filmových elektrod, kde se jedná opět o tenkou vrstvu bismutu na povrchu vhodného nosiče jako u BiFE, ale tato vrstva je stabilní a opakovaně použitelná [46]. První zmíněná varianta, tedy BiFE, je v současné době nejrozšířenější. Vlastnosti elektrod s bismutovým filmem bývají popisované jako srovnatelné s vlastnostmi rtuťových elektrod, a to včetně dostupného potenciálového okna v katodické oblasti [47]. Vzhledem k tomu, že bismut je méně ušlechtilý kov než rtuť, mají bismutové elektrody ve skutečnosti využitelné potenciálové okno omezenější. Jako podobné může být označeno rovněž chování bismutových a rtuťových elektrod v anodické rozpouštěcí voltametii, což je dáno způsobem nakoncentrování analytu při analýze. Zatímco u rtuťových elektrod dochází k tvorbě amalgámů, obdobně na bismutových elektrodách vznikají tzv. intermetalické sloučeniny bismutu se stanovovanými kovy. Bismut jako elektrodový materiál samozřejmě nemůže

konkurovat kapkám rtuťi ve způsobu obnovování povrchu a regenerace bývá realizována u pevných elektrod leštěním nebo zařazením vhodných elektrochemických operací, zatímco u filmových elektrod lze navíc vytvořit na povrchu nový film bismutu [48].

Nejčastěji využívanou variantou je BiFE. Bismutové filmy se připravují elektrolyticky vyloučením tenkého povlaku Bi na povrchu vhodného podkladu, např. elektrody ze skelného uhlíku (GCE) [46, 49-51], borem dopované diamantové elektrody [52], uhlíkové pastové elektrody (CPE) [53, 54], uhlíkových vláken [49, 55], sítotiskové elektrody (SPE) [56] a v nedávné době byla jako substrát pro přípravu BiFE použita i AgSAE [57, 58]. Nejběžnější je vylučování Bi filmu *in situ*, kdy se povlak Bi vylučuje na elektrodovém povrchu elektrolyticky přímo v měřeném roztoku simultánně s analytem za podmínek prekoncentračního kroku anodické rozpouštěcí analýzy a příbuzných technik [48]. Zdrojem bismutu je zpravidla $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ přidávaný do analyzovaných vzorků [59]. Další možností je vylučování bismutových filmů *ex situ* ze speciálních pokovovacích roztoků. Tyto roztoky opět nejčastěji představuje roztok $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ např. v octanovém pufru. Bismutové povlaky vyredukované externí cestou bývají kompaktnější, tvořené silnější vrstvou Bi než u depozice *in situ*, a mohou být použité pro celou sérii měření [46].

Nejnovější variantou bismutových filmových elektrod je tzv. naprašovaná bismutová elektroda, jejíž schéma je uvedeno na obrázku 6. Princip nanášení filmu v tomto případě spočívá v potažení substrátu, např. křemíkové destičky, tenkou vrstvou bismutu metodou fyzikální depozice par (PVD). Hlavní výhodou takto připravených elektrod je trvalost takto naneseného filmu a možnost dlouhodobého využívání. V současné době jsou komerčně dostupné ve formě tištěných elektrod s naprašovanou vrstvou bismutu ($\text{Bi}_{\text{sp}}\text{SPE}$). Tento typ elektrody byl úspěšně využit např. pro analýzu stopových množství kovů (Pb, Cd, Ni) [46].



Obrázek 6: Schéma naprašované bismutové elektrody [46].

1.1.2.3 Uhlíkové pastové elektrody

Uhlíkové pastové elektrody (CPE) byly popsány již na konci šedesátých let minulého století [60]. Tyto elektrody jsou připravovány mísením pastovací kapaliny, což je organická kapalina tvořící pojivo (např. minerální nebo silikonové oleje a tuky), a práškového uhlíku. Pastovací kapalina musí být elektrochemicky neaktivní, hydrofobní, netěkavá. Vzniklá pasta je postupně vytlačována z těla elektrody a následně setřena filtračním papírem. Tímto krokem je zajištěno obnovování povrchu elektrody mezi jednotlivými měřeními a minimalizováno riziko pasivace povrchu elektrody [60]. Jde o obdobu odkapávání rtuťové kapky. Výhodou těchto pracovních elektrod je široký rozsah využitelných potenciálů, vysoká citlivost, dobrá iontová vodivost a nízká impedance. Další velkou výhodou je modifikace pasty přímísením vhodného modifikátoru při přípravě pasty. Oproti pevným elektrodám nevykazují dobrou mechanickou stabilitu a vykazují horší reprodukovatelnost měření [61].

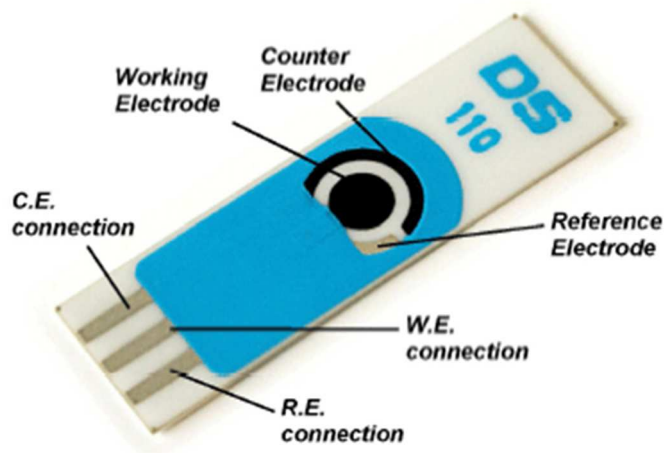
1.1.2.4 Kompozitní elektrody

Kompozitní elektrody (CE) jsou připravovány mísením minimálně jednoho izolátoru a jednoho vodiče [62]. Jako izolátor se nejčastěji používá teflon, polyetylen, ceresinový vosk nebo různé pryskyřice. Jako vodič lze použít práškový kov nebo různé formy uhlíku [62-64]. CE jsou stejně jako klasické pevné elektrody stabilní, mechanicky odolné a jejich povrch je třeba obnovovat leštěním nebo zařazením vhodného elektrochemického čistícího kroku. Podle použité vodivé složky mohou tyto elektrody vykazovat různě široké potenciálové okno a mohou tak být použity v katodické i anodické oblasti. Největším problémem CE je pasivace povrchu a tzv. elektrodová paměť. To znamená, že elektroda je zatížena předchozími měřeními a kvalita povrchu se v čase mění [65, 66]. Nejvíce rozšířené jsou z kovových stříbrné a zlaté kompozitní elektrody a hojně využívány jsou také kompozitní uhlíkové elektrody. CE jsou využívány hlavně v anodické rozpouštěcí voltametii, resp. při analýze iontů kovů (Tl, As, Pb) [67, 68].

1.1.2.5 Tištěné elektrody

Tištěné elektrody (screen printed electrode, SPE) patří mezi elektrody na jedno použití a vznikly ve snaze elektrochemické senzory miniaturizovat pro měření v malých objemech roztoků. Tyto elektrody se připravují technologií tlustých vrstev, tj. sítotisku. Pomocí této technologie se nanášejí vrstvy o tloušťce desítek mikrometrů. Na nevodivý nosič, který má obvykle tvar malého proužku, se nanese vodivá vrstva. Současně může být nanášen celý elektrodový systém (obrázek 7). Nejčastěji se používá pasta na bázi uhlíku, mohou však být

využity také částice drahých nebo obecných kovů. Vzhledem k jednorázovému použití tohoto typu senzorů dochází k eliminaci problémů, které souvisí s pasivací povrchu elektrody. Nevýhodou je nutnost likvidace po jejich použití [69].



Obrázek 7: Komerčně dostupná SPE [70].

1.1.2.6 Modifikované elektrody

Samostatnou kapitolou v oblasti elektroanalytického výzkumu jsou modifikace elektrodových povrchů (např. nanomateriály, biopolymery, DNA, apod.), a to zejména z důvodu zvýšení selektivity a citlivosti stanovení. Navázáním modifikátoru se může měnit selektivita elektrody k určitým analytům. Zvýšení citlivosti může být dáno např. urychlením probíhající elektrodové reakce, usnadněním akumulace analytu na modifikovaném elektrodovém povrchu nebo naopak znesnadněním přístupu možného interferentu k povrchu elektrody. Existují různé možnosti modifikace pracovních elektrod. Jednou z nich je zabudování vhodného modifikátoru do polymerního filmu na povrchu elektrody, možností je elektropolymerizace v přítomnosti rozpuštěného monomeru. Modifikátor lze také navázat chemicky (kovalentní vazbou) na povrch elektrody, spontánní chemisorpcí modifikátoru nebo fyzikální adsorpcí. Dále lze elektrody modifikovat různými nanomateriály (např.: uhlíkové nanotrubičky, kovové nebo uhlíkové nanočástice) nebo samoorganizujícími se (self-assembled) vrstvami a pro biochemické účely se elektrody modifikují např. DNA [9].

1.2 Borem dopovaná diamantová elektroda

Samotný diamant je pozoruhodný materiál s mimořádnými vlastnostmi, které zahrnují chemickou odolnost, optickou transparentnost a tepelnou vodivost. Protože se jedná o přírodní izolant, pro elektrochemické účely je nutné jej dopovat atomy různých prvků, nejčastěji atomy boru, a tím z něj vytvořit polovodič s širokým potenciálovým oknem [71]. Kromě boru byly studovány i jiné typy dopantů, např. vodík, dusík, fosfor nebo síra [72, 73]. Borem dopované diamantové elektrody (BDDE) mají široké možnosti využití a jejich vlastnosti jsou zkoumány od počátku osmdesátých let 20. století. První studie o diamantových elektrodách byla vydána japonskými vědci v roce 1983 [74].

1.2.1 Příprava borem dopovaných diamantových elektrod

Borem dopované diamantové filmy se obvykle připravují metodou tzv. chemické depozice par (CVD) a používají se ve formě tenkých polykrystalických filmů. K depozici diamantového filmu je nejčastěji používána směs methanu a vodíku, dopování borem je dosaženo přidáváním diboranu nebo trimethylboru do této směsi plynů. Jak již bylo výše uvedeno, bor je nejčastěji používaným dopantem k výrobě vodivých diamantových elektrod. To je dáno tím, že bor má nízkou aktivační energii přenosu náboje (0,37 eV). Aktivace plynu je prováděna pomocí technik, které využívají mikrovlnného plazmatu (MP CVD) nebo žhaveného vlákna (HF CVD). Nově připravené BDDE na svém povrchu mají většinou monovrstvu vodíku, čehož je dosaženo zaváděním vodíku do reakční komory v konečné fázi depozice. Povrch diamantu s volnými vazbami ukončenými vodíkem (H-terminovaný) je hydrofobní a relativně málo aktivní. Na druhé straně oxidovaný povrch diamantu (O-terminovaný) obsahuje kyslíkaté funkční skupiny, a je hydrofilní. Vlastnosti borem dopovaných diamantových filmů jsou významně ovlivněny zejména množstvím a typem použitého dopantu, morfologickými vlastnostmi (přítomností povrchových defektů), přítomností nečistot (sp^2 uhlík), krystalografickou orientací a povrchovou terminací [75-77].

Katodickou či anodickou předúpravou elektrody lze docílit O-terminovaného nebo H-terminovaného povrchu. Přeměna vodíkem terminované elektrody na elektrodu terminovanou kyslíkem je dána hodnotou pH roztoku a vkládaným potenciálem. Mimoto i vzdušný kyslík má vliv na stabilitu vodíkového povrchu. BDD filmy s H-terminovaným povrchem vykazují rychlejší přenos elektronů. Vzhledem k tomu, že se na elektrody neadsorbují polární sloučeniny, je na koncích potenciálového okna zpomalen vývoj vodíku a kyslíku [78]. Oxidace se obvykle provádí elektrochemicky v kyselém prostředí, kdy je na elektrodu vložen

kladný potenciál z oblasti rozkladu základního elektrolytu. Anodické předčištění se zpravidla provádí k odstranění nečistot, resp. pasivace elektrody [78-80]. Na elektrodě dochází ke vzniku OH radikálů (rovnice 1), které oxidují povrch BDDE.



Katodické předčištění se provádí vložením záporného potenciálu a opět v kyselém prostředí. H-terminovaný povrch obvykle umožňuje rychlejší přenos elektronů, lepší opakovatelnost a zvýšení signálu analyzované látky. Katodická předúprava musí být použita těsně před elektrochemickým měřením, aby byly získávány reprodukovatelné a spolehlivé výsledky vzhledem k nestabilitě H-terminovaného povrchu elektrody na vzduchu [80].

1.2.2 Charakterizace borem dopovaných diamantových elektrod

Jak již bylo výše zmíněno, vlastnosti BDDE jsou významně ovlivněny obsahem boru v diamantovém filmu a čistotou vytvořeného filmu. Elektrody pak mohou mít kovové, polovodičové nebo supravodivé vlastnosti. Obsah boru v materiálu elektrody je obvykle 10^{17} až 10^{21} atomů B na cm^3 diamantového filmu. Koncentrace 10^{20} atomů B na cm^3 odpovídá 1 atomu boru na 1000 atomů uhlíku. Častěji se obsah boru vyjadřuje jako poměr boru a uhlíku (B/C) ve směsi plynů při depozici. Uvedený rozsah odpovídá poměru B/C v plynné fázi od 500 do 15 000 ppm [81]. Další zmiňovanou vlastností BDDE ovlivňující jejich elektrochemické chování je jejich mikroskopická či nanoskopická hrubost, čili velikost narostlých mikrokystalů či nanokystalů borem dopovaného diamantu, kterou lze ovlivnit podmínkami v průběhu procesu chemické depozice par nebo typem substrátu. S rostoucí hrubostí povrchu se zužuje dostupné potenciálové okno a zvyšuje se elektrochemická aktivita. Hrubost povrchu ovlivňuje také kinetiku sledovaných elektrodových reakcí, přičemž s rostoucí hrubostí se obvykle zvyšuje i jejich reverzibilita. Rostoucí hrubost povrchu dále usnadňuje přenos náboje a umožňuje přechod z oblasti kinetické kontroly do oblasti difúzní kontroly elektrodových reakcí, což může být výhodné pro elektroanalytické využití [44].

BDDE lze charakterizovat různými metodami:

1. Spektrální a mikroskopické metody pro povrchovou charakterizaci:
 - Ramanova spektroskopie;
 - Mikroskopie atomárních sil;
 - Skenovací elektronová mikroskopie.
2. Elektrochemické metody pro studium elektrochemických vlastností:

- Elektrochemická impedanční spektroskopie;
- Cyklická voltametrie.

1.2.2.1 Spektrální a mikroskopické metody povrchové charakterizace

Nejčastěji je pro charakterizaci samotného materiálu používána *Ramanova spektroskopie*. Tato metoda se řadí do elektromagnetických spektroskopí a využívá Ramanova rozptylu, kdy elektromagnetické záření interaguje s vibračními a rotačními stavy atomů. Rozptýlené záření má větší nebo menší vlnovou délku, než záření dopadající, která odpovídá velikosti rozdílu kvantových hladin zkoumaného povrchu. Tato metoda je velmi citlivá k amorfnímu a grafitickému uhlíku. Typická Ramanova spektra odpovídající monokrystalickému diamantovému filmu jsou měřena při vlnové délce 632 nm. Získaná spektra obsahují pás typický pro diamant okolo vlnové délky 1332 cm^{-1} , který postupně klesá a dochází k jeho posunu s rostoucím obsahem B. Dále je pozorován typický nárůst odpovídající zvyšujícímu se obsahu B okolo 500 a 1225 cm^{-1} . Také je možno detekovat amorfni nebo sp^2 hybridizovaný uhlík a to zejména u méně kvalitních BDD filmů [82-87].

Mikroskopie atomárních sil (AFM) je využívána k trojrozměrnému skenování povrchů. Při skenování je využíván ostrý hrot, který je připevněn na pružině. AFM je tedy založena na působení meziatomárních sil mezi hrotem a povrchem vzorku. Nevýhodou této metody je skenování pouze malé části povrchu. Vzhledem k tomu, že zastoupení jednotlivých složek ve filmu je nerovnoměrné, výsledek AFM tedy dostatečně film necharakterizuje [88].

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) umožňuje pozorovat studované materiály o velikosti až jednotek nm. Principem SEM je interakce svazku elektronů s povrchem zkoumaného objektu. Působením urychleného primárního svazku na vzorek (ve směru řádek po řádku) dochází k ovlivnění tvaru oblasti pod povrchem vzorku. Zde se začnou náhodně pohybovat primární elektrony. Na základě svého chaotického pohybu generují signály. Matematickou úpravou těchto signálů lze získat informace o povrchu vzorku – např. tloušťka připraveného filmu nebo velikost krystalů [89].

1.2.2.2 Elektrochemické metody pro studium elektrochemických vlastností

Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS) je perspektivní metoda pro výzkum objemových a mezifázových elektrických vlastností různých druhů kapalných nebo pevných materiálů spojených s vhodným elektrochemickým převodníkem (elektrodoým podkladem). EIS je úspěšně používána při návrhu a vývoji senzorových systémů. V klasické potenciostatické variantě se na pracovní elektrodu vkládá konstantní potenciál se

superponovaným střídavým napětím o určité amplitudě (zpravidla v rozsahu 5-10 mV) a měří se střídavá složka proudové odezvy. Potenciál je buď zvolen, nebo se měří při potenciálu nezatíženého obvodu, což je vlastní potenciál proudově nezatížené (nezapojené) elektrody. Frekvence střídavého napětí se při měření mění s časem a obvykle se měří od vyšších frekvencí k nižším. EIS je používána především ke kvalitativnímu popisu elektrochemického chování systému a obvykle je kombinována s dalšími technikami. Výhodou EIS je, že poskytuje komplexní popis elektrochemického chování zkoumaného systému, např. informace o kinetice či mechanismu elektrodového děje [90].

Cyklická voltametrie (CV) se využívá ke studiu elektrochemických vlastností diamantového filmu a obvykle je využívána v kombinaci s reverzibilními redoxními systémy, např. $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$, které byly v této práci použity. Redoxní systémy řadíme do dvou skupin, podle toho jakým způsobem je realizován přenos elektronu mezi elektrodou a roztokem. Rozlišujeme *outer-sphere* nebo *inner-sphere* reakce, tzn. reakce řízené mechanismem vnější resp. vnitřní sféry. Mezi *outer-sphere* systémy patří např. již zmíněný redoxní systém $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$, $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+/3+}$, $\text{IrCl}_6^{2-/3-}$, methyl violet, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+/2+}$ nebo chlorpromazin. V tomto případě elektroda slouží pouze jako zdroj elektronů a kinetika probíhajících elektrodových reakcí je pouze málo citlivá na povrch nebo mikrostrukturu elektrody. Přenos elektronu tedy není příliš ovlivněn materiálem elektrody. Do skupiny *inner-sphere* řadíme např. $\text{V}_{\text{aq}}^{2+/3+}$, $\text{Eu}_{\text{aq}}^{2+/3+}$ nebo $\text{Fe}_{\text{aq}}^{3+/2+}$. Redoxní systém $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{3-/4-}$ a kyselina askorbová jsou v případě kovových elektrod a elektrod tvořených sp^2 uhlíkem řazeny mezi *outer-sphere*, ale v případě BDDE patří také mezi systémy *inner-sphere*. Reakce v tomto případě probíhá přes specifickou interakci analytu s povrchem elektrody. Jedná se o systémy velmi citlivé na stav povrchu elektrody a hustotu elektronických stavů blízko formálního potenciálu [91-93].

Při dokonale reverzibilní reakci dochází k výměně jednoho elektronu a může být charakterizována rozdílem potenciálu katodického a anodického signálu (ΔE_p), který činí 59 mV. Vzhledem k tomu, že BDDE nemají hladký atomární povrch jako elektroda rtuťová, dosahuje se této hodnoty jen výjimečně. V elektrodovém ději se uplatňují faktory jako je např. adsorpce, kinetické vlivy nebo vodivost elektrody, které ovlivňují přenos elektronu [44]. Se zvyšujícím se obsahem boru se obvykle reverzibilita elektrodové reakce zvyšuje. Potenciálové okno se se zvyšujícím se obsahem boru naopak zužuje a toto zúžení je mnohem výraznější na katodické straně. Elektrochemicky aktivní místa na povrchu elektrody závisí na účinnosti dopování borem a zdá se, že s klesajícím poměrem B/C klesá dostupnost těchto

elektrochemicky aktivních míst, což vede ke zmiňovanému rozšíření potenciálového okna. Dále je rostoucí koncentrací boru v BDD filmu ovlivněna také mez detekce, která se obvykle snižuje. Se zvyšujícím se poměrem B/C se obvykle zlepšuje citlivost a opakovatelnost stanovení [94-96].

Dalším důležitým parametrem, který lze získat z CV je zdánlivá rychlostní konstanta přenosu náboje (k_{app}^0) podle Nicholsona [97]. Tato konstanta se počítá ze závislosti ΔE_p na rychlosti polarizace (v) podle rovnice (1):

$$\psi = \gamma^\alpha k_{app}^0 / \sqrt{\pi a D_o} . \quad (1)$$

Ψ	míra reversibility elektrodové reakce
γ	poměr difuzních koeficientů oxidační a redukční formy
α	koeficient přenosu náboje
k_{app}^0	zdánlivá rychlostní konstanta přenosu náboje
D	difuzní koeficient
a	nFv / RT
n	počet vyměňovaných elektronů
F	Faradayova konstanta
v	rychlost polarizace
R	plynová konstanta
T	teplota

Hodnoty k_{app}^0 slouží ke kvalitativnímu odhadu přenosu náboje. Čím je konstanta k_{app}^0 vyšší, tím dochází k lepšímu přenosu e^- , což souvisí s lepšími elektrodovými vlastnostmi použitého elektrodového materiálu. Se zvyšujícím se poměrem B/C u BDDE dochází obvykle ke zvyšování zdánlivé rychlostní konstanty. Hodnoty k_{app}^0 mezi 0,01 a 0,2 cm s^{-1} jsou běžně počítány u polykrystalických filmů (mikrokrystalických nebo nanokrystalických) [78].

Materiál BDD elektrod je typicky polykrystalický s množstvím krystalografických orientací, vysokým obsahem boru a nízkým obsahem nediamantových nečistot. Vlastnosti těchto elektrod jsou ovlivněny také hranicemi jednotlivých zrn a defekty. Vícečetné krystaly a defekty nebo přítomné nediamantové uhlíkové fáze poskytují prostor pro heterogenní přenos elektronů. To může vést ke vzniku lokálních variací ve struktuře vzniklé dvojvrstvy na povrchu elektrody. Uvedeným způsobem může být ovlivněna konstanta k_{app}^0 daného

redoxního systému. Heterogenní přenos elektronu je charakterizován jako přenos elektronu mezi elektrodou a daným analytem v roztoku. Obecně lze říci, že elektrochemické vlastnosti BDDE jsou ovlivněny zejména koncentrací a typem dopantu, morfologickými vlastnostmi (defekty), hlavní krystalografickou orientací, terminací povrchu, hranicemi jednotlivých zrn a přítomností nediamantových fází na bázi amorfního uhlíku [98].

1.2.3 Vliv obsahu boru na vlastnosti borem dopovaných diamantových elektrod

Vlivem obsahu boru na morfologické i elektroanalytické vlastnosti BDDE se ve své práci zabývali např. K. Schwarzová-Pecková a kol. [78]. Autoři testovali BDDE s poměrem B/C od 500 do 8000 ppm. K elektrochemické charakterizaci elektrod použili CV redoxního systému $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (inner-sphere) a $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ (outer-sphere). Pro oba redoxní systémy bylo zjištěno, že se zvyšujícím se poměrem B/C dochází ke zvyšování konstanty k_{app}^0 . Z toho vyplývá, že méně dopované elektrody (500 a 1000 ppm) vykazují pomalejší průběh elektrodové reakce. Dále bylo zjištěno, že šířka potenciálového okna se se zvyšujícím se obsahem boru zmenšovala. Vliv obsahu boru na analytickou využitelnost elektrod byl v této práci testován při stanovení 2-aminofenylu [78]. Dalšími autory, kteří se věnovali BDDE s různým obsahem boru byli N. G. Ferreira a kol. [82]. Ti studovali elektrochemickou reverzibilitu redoxních systémů $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ a hydrochinonu a používali BDDE s poměrem B/C v plynné fázi od 2000 do 20 000 ppm. U obou analytů bylo prokázáno quazi-reverzibilní chování. Hodnota k_{app}^0 byla určena v rozmezí 10^{-4} a $10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) a 10^{-6} a $10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ (hydrochinon). Maximální hodnota této veličiny neboli nejrychlejší elektrodová reakce byla pozorována na elektrodách s vyšší kvalitou krystalů a nižším obsahem nečistot, konkrétně na elektrodě 5000 ppm. Elektrody s vyšším obsahem boru obsahovaly i více nečistot, proto byly získané rychlostní konstanty k_{app}^0 nižší. Naměřené redoxní signály obou systémů se zvyšovaly s rostoucím poměrem B/C [82]. Dále byly publikované práce zabývající se vlivem obsahu boru v BDD filmech např. na redukci dusičnanů [83] nebo odbourávání organických polutantů [99-101].

1.2.4 Aplikace borem dopovaných diamantových elektrod

Mezi hlavní výhody, které činí borem dopovaný diamant mimořádně perspektivním elektrodovým materiálem, patří široké potenciálové okno (např. od $-1,5 \text{ V}$ do $+1,5 \text{ V}$ v prostředí $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$), nízká kapacita elektrické dvojvrstvy mající za následek nízký zbytkový proud a velmi malý šum, mechanická robustnost a stabilita

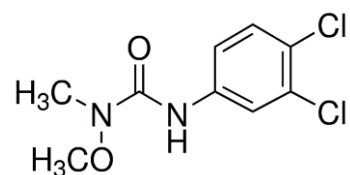
umožňující využití těchto elektrod v průtokových systémech, nízká náchylnost k pasivaci elektrody díky parafinickému charakteru povrchu (sp^3 hybridizované atomy uhlíku) mající za následek minimální adsorpci látek na povrch elektrody, biokompatibilita umožňující snadnou implantaci těchto elektrod do živé tkáně s minimální pravděpodobností negativní biologické odezvy [44]. Vzhledem ke svým velmi dobrým elektrochemickým vlastnostem byly borem dopované diamantové elektrody úspěšně aplikovány pro stanovení řady látek nejčastěji v oblasti organické analýzy [81]. Pesticidy jsou jednou ze skupin látek, které byly stanovovány na BDDE, např. atrazin [102], triclopyr [103], terbutryn [104] nebo karbamátové pesticidy [105]. Další úspěšnou aplikací v organické analýze bylo stanovení různých léčiv např. acetaminofen [106], propranolol a atenolol [107] nebo metotrexát [108]. Povrch BDDE lze také různými způsoby modifikovat, např. proteiny [109], DNA [110] nebo enzymy [111].

V této disertační práci byla BDDE použita pro studium voltametričného chování herbicidu linuronu a léčiv mesalazinu a leukovorinu. Byly také vyvinuty metody stanovení těchto látek, které byly aplikovány při analýze praktických vzorků. Vzhledem k tomu, že elektrochemické vlastnosti BDDE jsou závislé mimo jiné na obsahu boru v diamantovém filmu, cílem této práce bylo rovněž testování povrchových a elektrochemických vlastností BDDE s různým obsahem boru a současně jejich možností při praktické aplikaci, a to stanovení výše uvedených analytů.

1.3 Studované látky

1.3.1 Linuron

Linuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylurea, LIN, obrázek 8) je herbicid na bázi substituované močoviny. Jedná se o selektivní, systémově působící pesticid hubící zejména jednoleté dvouděložné plevely [112].



Obrázek 8: Strukturální vzorec linuronu [113].

1.3.1.1 Vlastnosti a význam linuronu

Linuron byl poprvé registrován jako pesticid v USA v roce 1966. Agentura pro ochranu životního prostředí (EPA) vydala registrační standard pro LIN v červnu 1984. Od roku 1984 do roku 1988 byl LIN předmětem speciálního přezkoumání, protože překročil kritéria rizika onkogenicity. Dne 2. března 2017 vstoupilo v platnost prováděcí nařízení Komise (EU) č. 2017/244 ze dne 10. února 2017, kterým se v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009, neobnovuje schválení účinné látky LIN. Přípravky s touto účinnou látkou je umožněno uvádět na trh nejdéle do 3. 12. 2017. Nakoupené zásoby přípravků lze spotřebovat nejdéle do 3. 6. 2018 [114, 115].

Jedná se o bílou krystalickou pevnou látku bez zápachu, která je nepatrně rozpustná ve vodě. U herbicidu LIN je podle směrnic EU 67/548/EHS nebo 1999/45/ES podezření na karcinogenní účinky. Může poškodit plod v těle matky. Je zde možné nebezpečí poškození reprodukční schopnosti. LIN je zdraví škodlivý při požití – při dlouhodobé expozici požíváním. Je vysoce toxický pro vodní organismy a může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí. Z hlediska akutní toxicity bylo stanoveno LD50 orálně na kryse jako 1,146 mg kg⁻¹. LIN se řadí podle EPA do třídy toxicity III (mírně toxický) [112, 113].

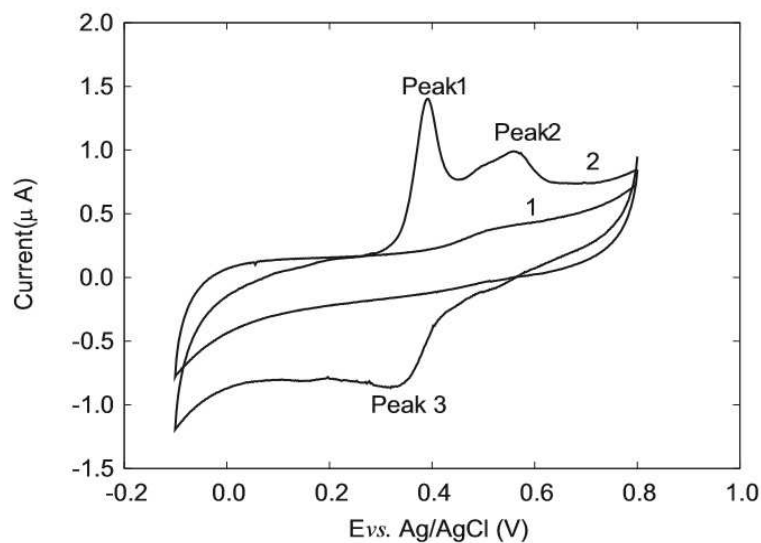
LIN je herbicid používaný ke kontrole klíčení, nově vznikajících trav a širokolistých plevelů. Používá se na zemědělské plodiny (např. brambory, sóju, kukuřici, pšenici atd.), okrasné cibule a topoly. LIN se využívá ve formě dispergovatelných granulí, smáčitelných

prášků, tekutých koncentrátů, nebo emulgovatelných koncentrátů/kapalných suspenzí. Používá se k hubení jednoletých i víceletých listnatých a travnatých plevelů. Tento herbicid lze aplikovat pre- nebo post-emergentně. Funguje tak, že inhibuje fotosyntézu plevelů. LIN je snadněji absorbován kořeny rostlin než jejich listy. Rychlost, kterou je LIN absorbován, translokován, a následně rozložen se liší u různých druhů rostlin [114, 116]. V půdách je středně perzistentní s poločasem rozpadu 30 až 150 dní v závislosti na podmínkách. Reprezentativní poločas rozpadu je odhadován na 60 dní. Hlavním procesem, kterým je LIN odstraňován z půd je mikrobiální degradace. Procesy fotodegradace a volatilizace nejsou již tak významné z hlediska odstraňování LIN z půdy. Méně toxické než samotný LIN jsou jeho metabolity (3,4-dichloranilin a oxid uhličitý) [112].

1.3.1.2 Voltametrické chování linuronu

Stanovením linuronu se ve své práci z roku 1990 zabývali autoři P. Hernandez a kol. Jako pracovní elektroda byla využívána CPE modifikovaná sepiolitem. Bylo zjištěno, že LIN může být adsorbován přímo z vodného roztoku na povrch pracovní elektrody a poté stanoven AdS DPV [117]. CPE využívali ve své práci také F. de Lima a kol., a to v kombinaci s AdS SWV pro stanovení herbicidu LIN ve vodě (destilované a přírodní) a v zelenině (mrkvi, bramborách a cibuli). Voltametrické chování LIN bylo v této práci studováno s využitím CV (při zařazení akumulace analytu na povrchu pracovní elektrody) a bylo zjištěno, že LIN poskytuje 2 anodické signály a 1 katodický pík (obrázek 9) [118]. Také autoři J. Đorđević a kol. ve své práci využívali CPE, tentokrát v modifikaci s tricresyl fosfátem (TCP-CPE) [1119]. Vedle CPE, sloužily pro stanovení LIN mikroelektrody z uhlíkových vláken. Např. M. J. Gonzáles de la Huebra a kol. aplikovali tento typ pracovní elektrody pro stanovení LIN ve vzorcích půdy a opět využívali AdSV [120, 121].

Dalšími autory, kteří studovali elektrochemické chování LIN, tentokrát na laboratorně vyráběné GCE a na modifikované borem-dopované GCE (GCB) v kombinaci s DPV, byli J. S. Đorđević a kol. Získané výsledky autoři porovnávali s výsledky získanými na komerční GCE [122]. V roce 2015 vyšla práce autorů L. C. S. Figueiredo-Filhoa a kol., kteří využívali pro stanovení LIN ve vzorcích přírodní vody borem-dopovanou diamantovou elektrodu a BDDE modifikovanou platinovými nanočásticemi (PtNP-BDDE). Ke stanovení LIN byla v této práci použita DPV. Pro stanovení počtu elektronů účastnících se redoxního procesu autoři použili metodu SWV a určili počet vyměněných elektronů $n = 3$ [123]. Získané limity detekce pro jednotlivé metody a pracovní elektrody jsou shrnuty v tabulce 1.



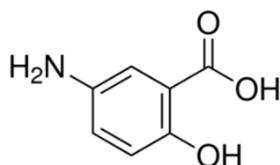
Obrázek 9: Cyklický voltamogram (11 mg L^{-1} LIN, BRB pH 5,5) zaznamenaný na CPE, před (křivka 1) a po (křivka 2) elektrochemické předúpravě povrchu elektrody [118].

Tabulka 1 Detekční limity (LOD) pro stanovení LIN s využitím jednotlivých pracovních elektrod a jednotlivých polarografických a voltametričeských technik

Metoda	Pracovní elektroda	LOD [mol L^{-1}]	Literatura
AdS DPV	sepiolitem modifikovaná CPE	3×10^{-7}	[117]
AdS SWV	CPE	9×10^{-8}	[118]
DPV	TCP- CPE	2×10^{-6}	[119]
AdSV	mikroelektroda z uhlíkových vláken	3×10^{-7}	[120]
DPV	GCB	6×10^{-6}	[122]
DPV	lab-made GCE	1×10^{-5}	[122]
DPV	BDDE	2×10^{-7}	[123]
SWV	BDDE	1×10^{-7}	[123]
DPV	PtNP-BDDE	2×10^{-7}	[123]
SWV	PtNP-BDDE	8×10^{-7}	[123]

1.3.2 Mesalazin

Mesalazin (5-amino-2-hydroxybenzoová kyselina, 5-ASA, obrázek 10), neboli kyselina 5-aminosalicylová, je velice důležité léčivo ze skupiny aminosalicylátů, které se využívá v léčbě střevních zánětů jako je např. Crohnova nemoc nebo ulcerózní kolitida. Jedná se o nejvíce využívaný lék z této skupiny léčiv. 5-ASA má protizánětlivé, systémové a lokální účinky [124].



Obrázek 10: Strukturální vzorec mesalazinu [125].

1.3.2.1 Vlastnosti a význam mesalazinu

5-ASA je pevná látka purpurové barvy, která by měla být uchovávána bez přístupu světla. Podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) nebyla žádná ze složek tohoto produktu identifikována jako pravděpodobný, možný nebo potvrzený karcinogen [125]. Prekurzorem 5-ASA je léčivo sulfasalazin. 5-ASA je tedy (spolu se sloučeninou sulfapyridin) rozpadovým produktem léku sulfasalazinu. Ten se hojně používal k léčbě zánětlivých onemocnění v minulosti, později byly ale vyvinuty nové léky obsahující jako účinnou látku přímo 5-ASA. Ty mají méně nežádoucích účinků, než původní sulfasalazin.

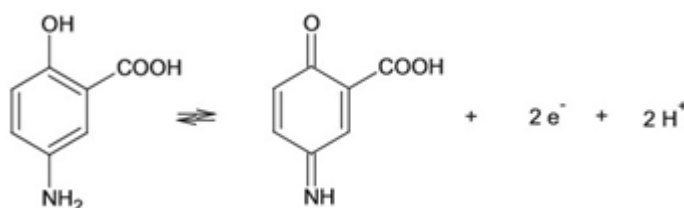
5-ASA je tedy látka používaná jako lék na nemoci ze skupiny idiopatických střevních zánětů. Jak již bylo výše řečeno, mezi nespecifické střevní záněty patří mimo jiné Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida. Na obě tyto choroby zabírá 5-ASA stejně dobře. Je využíván v různých lékových formách. Nejmodernější lékovou formu představují tzv. sachety, což jsou mikrogranule potažené ethylcelulózou. Po jejich požití pacientem dochází k postupnému uvolňování 5-ASA v celé délce trávicí trubice. Tato forma léčiva zaručuje trvalé a rovnoměrné dodávání léku od dvanáctníku až po konečník. Výhodou sachet je, že se hodí pro nemocné s nespecifickými střevními záněty umístěnými kdekoli ve střevě. Další možnou lékovou formou 5-ASA jsou čípky pro rektální podání. Čípky jsou vhodné zejména pro pacienty s projevy ulcerózní kolitidy v oblasti konečníku. Dále se 5-ASA využívá ve formě retardovaných tablet. Jedná se o prášky s prodlouženým uvolňováním, které umožňují pomalé a konstantní dávkování 5-ASA do celého střeva [126, 127]. 5-ASA v různých lékových

formách tvoří základ léčby Crohnovy choroby, jelikož se v 50 % uvolňuje v tenkém střevě a v 50 % v tlustém střevě, což pokrývá nejobvyklejší lokalizace zánětu. Patří mezi bezpečné léky s minimem nežádoucích účinků, vzácně může způsobit průjem, bolesti hlavy, vyrážku či trombocytopenii. Lék působí proti oxidativnímu stresu a ačkoliv tlumí místní zánětlivé reakce, nezpůsobuje oslabení imunity [128]. 5-ASA se pro své protizánětlivé účinky používá také u některých revmatických onemocnění (revmatoidní artritida, ankylozující spondylitida – Bechtěrevova nemoc). 5-ASA blokuje aktivitu tzv. mediátorů zánětu – látek zodpovědných za rozvoj zánětu i za růst buněk, který ve stěně trávicího traktu pod jejich vlivem probíhá a který může vyústit až v nekontrolované nádorové bujení. 5-ASA je lékem, který bývá pro své vlastnosti použit jako vhodný doplněk terapie v kombinaci s celou řadou dalších preparátů. Mimo jiné je i nezbytným doplňkem biologické léčby [126].

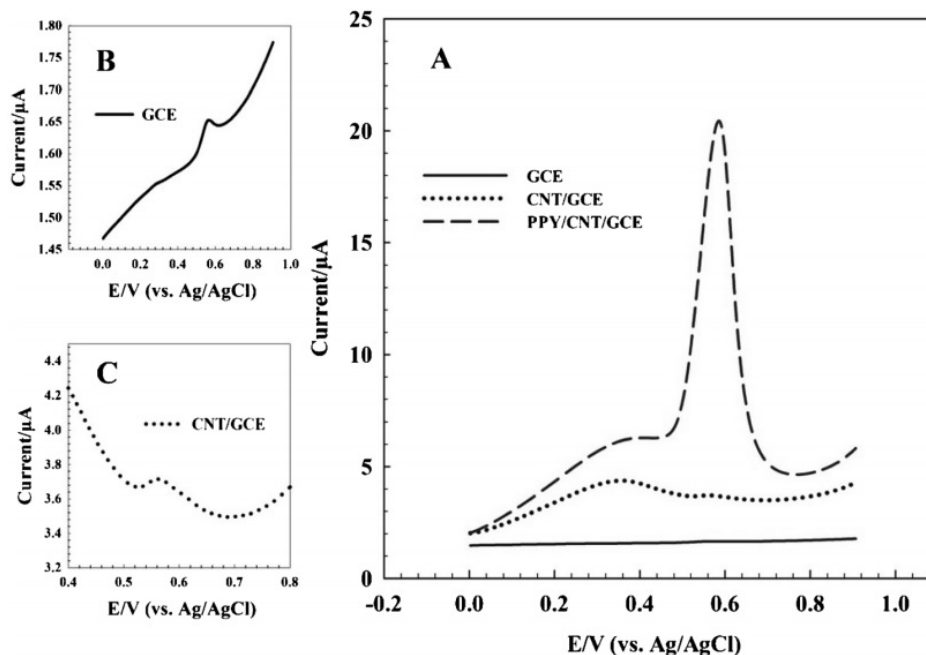
1.3.2.2 Voltametrické chování mesalazinu

Autoři Palsmeier a kol. ve své práci z roku 1992 popsali oxidační mechanismus 5-ASA s využitím GCE. 5-ASA může být oxidován na chinon-iminovou formu prostřednictvím dvou-elektronového, dvou-protonového oxidačního kroku. Příslušný oxidační signál tedy odpovídá spřažené dvouelektronové oxidaci za vzniku příslušného chinoniminu (obrázek 11). Tento proces je reverzibilní, ale odpovídající redukční signál může být pozorován pouze při vysokých rychlostech polarizace [129].

Veškeré použité voltametrické techniky, pracovní elektrody a zjištěné limity detekce jsou shrnuty v tabulce 2. Pro stanovení 5-ASA byly navrženy elektroanalytické techniky používající GCE. Například Shahrokhian a kol. studovali voltametrické chování 5-ASA pomocí GCE modifikované vícečetnými uhlíkovými nanotrubicemi s filmem polypyrolu (PPY/CNT/GCE) s využitím metody stejnosměrné voltametrie s rychlým skenem (LSV). Na obrázku 12 je uveden voltamogram 5-ASA zaznamenaný s využitím GCE, GCE modifikované uhlíkovými nanotrubicemi (CNT/GCE) a MWCNTs/GCE [130].



Obrázek 11: Navržený oxidační mechanismus 5-ASA [129].



Obrázek 12: LS voltamogram (0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 5-ASA) zaznamenaný na GCE (nepřerušovaná čára), CNT/GCE (tečkovaná čára) a na PPY/CNT/GCE (přerušovaná čára)[130].

Tabulka 2 Detekční limity (LOD) pro stanovení 5-ASA s využitím jednotlivých pracovních elektrod a jednotlivých polarografických a voltametrických technik

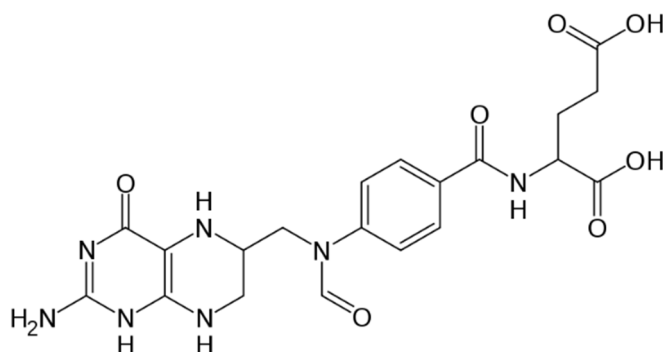
Metoda	Pracovní elektroda	LOD [mol L ⁻¹]	Literatura
LSV	PPY/CNT/GCE	3×10^{-9}	[130]
DPV	GCE	8×10^{-7}	[131]
LSV	GCE	5×10^{-6}	[132]
SWV	GCE	4×10^{-6}	[132]
SSV	GCE	3×10^{-7}	[132]
SWV	CNTs-N/GCE	1×10^{-8}	[133]
DPV	pencil graphite electrode	2×10^{-8}	[134]
CV	CTAB/CPE	2×10^{-9}	[135]

Dalšími autory, kteří ve své práci z roku 2003 použili pro stanovení 5-ASA ve farmaceutickém přípravku jako pracovní elektrodu GCE, tentokrát ve spojení s DPV, byli B. Nigović a B. Šimunić [131]. Dále Beckett a kol. studovali voltametrické chování 5-ASA s využitím LSV, SWV a sonoliner sweep voltametrie v kombinaci s GCE [132]. Další autoři,

kteří využívali CNT/GCE modifikovanou Nafionem ve spojení se SWV pro stanovení 5-ASA a jeho metabolitu v biologických vzorcích, jsou B. Nigović a kol. [133]. Další formou použité uhlíkové elektrody je tužková grafitová elektroda. Autoři C. V. Uliana a kol. využili tento typ pracovní elektrody pro stanovení 5-ASA v kombinaci s DPV [134]. V práci autorů A. B. Teradalea a kol. z roku 2017 byla pro stanovení 5-ASA aplikována CPE modifikovaná kationtovou povrchově aktivní látkou (CTAB/CPE) v kombinaci s CV [135].

1.3.3 Leukovorin

Leukovorin (5-formyltetrahydrofolát monoglutamát, LV, obr. 13), neboli kyselina folinová, patří do skupiny metabolitů kyseliny listové (FA) a jedná se o její redukovanou formu. LV se využívá v léčbě nádorových onemocnění, nejčastěji jako antidotum k ochraně zdravých buněk před toxickými účinky tzv. antifolátů, které jsou dávkovány ve vysokých množstvích při chemoterapiích [136, 137].



Obrázek 13: Strukturální vzorec leukovorinu.

1.3.3.1 Vlastnosti a význam leukovorinu

LV je béžový prášek bez zápachu. Je nereaktivní a neslučitelný se silnými oxidačními činidly. Z hlediska akutní toxicity je LV klasifikován jako netoxický a dle Nařízení (ES) č. 1272/2008 je uváděn jako dráždivý pro kůži, je dechově senzibilní, při kontaktu leukovorinu s očima může dojít k podráždění, způsobuje senzibilitu kůže a jednorázovou expozici pro cílový orgán, resp. dýchací systém [138].

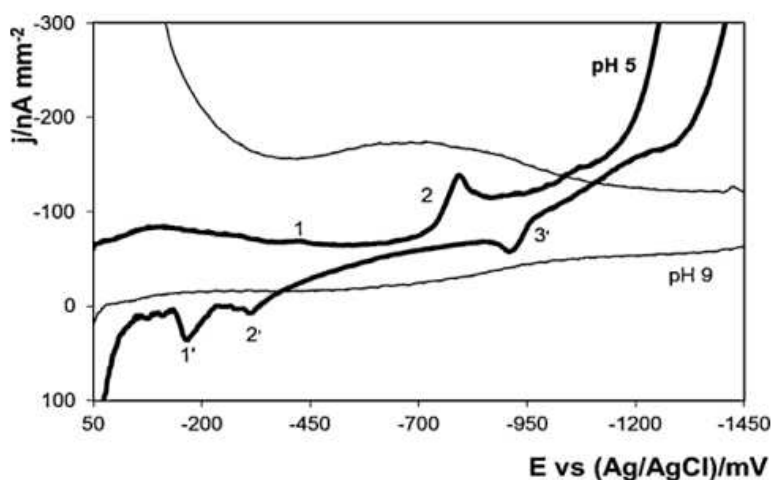
Foláty se v organismu podílejí na přenosu jednouhlíkových zbytků (C1), které jsou důležité při syntéze purinů a obecně hrají kyselina listová a foláty významnou roli v metabolismu aminokyselin, při syntéze nukleových kyselin, při tvorbě červených krvinek a při dělení a syntéze buněk [136, 139]. Proto LV našel široké uplatnění v současné medicíně.

Používá se při léčbě megaloblastické anémie s prokázaným deficitem kyseliny listové, pokud není možná terapie přímo FA. Jak již bylo uvedeno výše, významná je také aplikace v kombinaci s protinádorovými léčivy, kde buď působí jako jejich antidotum nebo naopak zvyšuje jejich cytostatický účinek. Příkladem může být aplikace LV spolu s protinádorovým léčivem metotrexátem. Metotrexát (MTX) je látka, která blokuje syntézu purinu v buňkách a inhibuje enzym dihydrofolát reduktázu, což vede k inhibici dělení buněk. Tento mechanismus je využíván zejména pro léčbu zhoubných nádorů buněk imunitního systému, maligních kostních nádorů a zhoubných nádorů vznikajících v děloze v příčinné souvislosti s těhotenstvím. Dále se MTX využívá při léčbě psoriázy, Crohnovy choroby a revmatoidní artritidy. Při léčbě MTX dochází ovšem také k toxickému účinku na zdravé, rychle proliferující tkáň a z tohoto důvodu se využívá jako antidotum LV [139, 140]. Vzhledem k podobné struktuře vstupuje MTX do buňky stejnými receptory jako foláty a výsledkem je porucha syntézy nukleových kyselin a zastavení dělení buněk. Naopak aplikace LV vede k obnovení reakcí folátů. LV vstupuje přednostně do zdravých buněk, u kterých způsobuje nedostatek redukováných folátů smrt po 42 až 48 hodinách. U maligních buněk, které jsou výrazně citlivější na přítomnost MTX, dochází k zániku mnohem dříve. Pokud by nebyl LV aplikován včas, došlo by kromě poškození rapidně se dělících rakovinových buněk také k poškození zdravých buněk [141]. LV může také zvyšovat cytostatický účinek některých protinádorových léčiv. Příkladem je aplikace LV v kombinaci s léčivem 5-fluorouracilem (5-FU), který je používán při léčbě karcinomů žaludku, tlustého střeva, slinivky břišní nebo také konečníku. Protinádorový účinek 5-FU je možno podpořit tzv. biochemickou modulací právě podáním LV, které musí vždy předcházet aplikaci 5-FU, aby nedocházelo ke zvýšení nežádoucích účinků cytostatika [136, 141].

1.3.3.2 Voltametrické chování leukovorinu

Voltametrické chování leukovorinu studovali jako první autoři D. Stejskal a M. Heyrovský ve své práci z roku 1994 [142]. Jako pracovní elektroda byla použita HMDE a měření probíhala v acetátovém pufru o pH 4,7 s využitím CV. Dále autoři navrhli metodu stanovení LV s využitím AdSV [142]. Dalšími autory, kteří studovali voltametrické chování LV jsou R. Šelešovská a kol. [139]. Pro studium voltametrického chování LV byla v jejich práci z roku 2012 použita CV a stacionární voltametrie (DCV) v kombinaci s HMDE, p-AgSAE a m-AgSAE. Pro samotné stanovení leukovorinu byla použita AdS DPV. Bylo zjištěno, že LV poskytuje na HMDE ve slabě kyselém prostředí (pH 5) 3 oxidační signály při potenciálech (-180; -330 a -950 mV) a 2 redukční signály při potenciálech (-440 a

-850 mV). Získaný cyklický voltamogram je uveden na obrázku 14. Zaznamenané oxidační píky 1' a 2' odpovídají podle autorů dvoustupňové oxidaci na pteridinovém jádře. Produkt této reakce byl dále opět redukován (signál 1). Oxidačnímu signálu 3' odpovídá příslušný redukční pík 2. Obdobné výsledky byly získány také s využitím AgSAE [139]. Dalšími autory, kteří se zabývali stanovením LV, byli Z. Zhu a kol. Ti využívali DPV ve spojení s modifikovanou GCE (PABSA/Q-MWNTs/GCE – p-aminobenzen sulfonová kyselina (ABSA) na GCE modifikované multi-wall uhlíkovými nanotrubicemi (Q-MWNTs/GCE)) [143]. Veškeré získané limity detekce, použité pracovní elektrody a metody pro stanovení LV jsou shrnuty v tabulce 3.



Obrázek 14: Cyklický voltamogram $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ LV získaný na HMDE v prostředí BRB o pH 5 a 9 [139]; 1, 2 – redukční píky poskytované oxidovaným LV, 1', 2', 3' - oxidační píky poskytované LV.

Tabulka 3 Detekční limity (LOD) pro stanovení LV s využitím jednotlivých pracovních elektrod a jednotlivých polarografických a voltametrických technik

Metoda	Pracovní elektroda	LOD [mol L ⁻¹]	Literatura
DPV	m-AgSAE	2×10^{-8}	[139]
DPV	p-AgSAE	5×10^{-8}	[139]
DPV	HMDE	1×10^{-6}	[139]
DPV	PABSA/Q-MWNTs/GCE	2×10^{-8}	[143]

2 Experimentální část

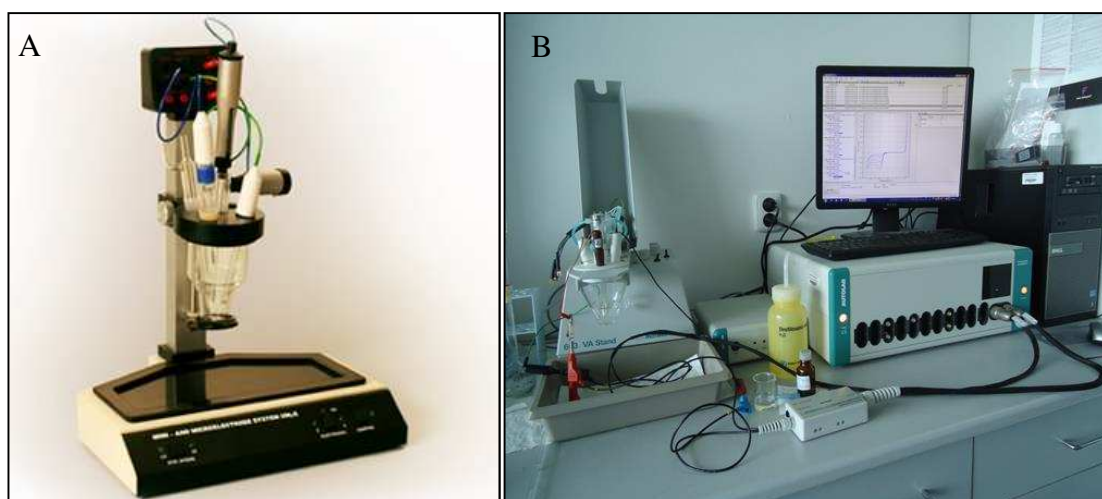
2.1 Použité chemikálie

Veškeré chemikálie, které byly využívány pro přípravu základních elektrolytů, standardních roztoků a dalších zásobních roztoků byly čistoty p.a. (není-li uvedeno jinak). BRB o pH 2-12 byl připravován mísením kyselé a alkalické složky. Kyselá složka se skládala z H_3PO_4 , CH_3COOH a H_3BO_3 , všechny o koncentraci $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. K přípravě kyselé složky BRB byly použity zásobní kyseliny 85% H_3PO_4 , 99,8% CH_3COOH a 99,8% H_3BO_3 (vše Ing. Petr Švec - PENTA, Praha). Alkalická složka byla tvořena roztokem $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH (Lachema, Brno). Základní elektrolyt na bázi 1; 0,5 a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HNO_3 byl připraven ředěním z 65% HNO_3 (Ing. Petr Švec - PENTA, Praha). Jako základní elektrolyt byl dále používán $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, který byl připraven rozpuštěním vhodné navážky (Ing. Petr Švec - PENTA, Praha). Všechny tyto roztoky byly připravovány v destilované vodě. Standardní roztok LIN o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním prášku LIN (Sigma-Aldrich) o čistotě 99,7 % v 70% acetonitrilu (Ing. Petr Švec - PENTA, Praha) a takto připravený zásobní roztok byl uchováván v lednici. Standardní roztok 5-ASA o koncentraci $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním příslušného množství 5-ASA prášku (Sigma-Aldrich) v $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HCl (Ing. Petr Švec - PENTA, Praha) a skladován v lednici. Roztok LV (Sigma-Aldrich) o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním odpovídající navážky jeho vápenaté soli v destilované vodě a skladován v lednici. $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ H_2SO_4 (96 %, Lach-Ner, Neratovice) byla využívána pro předúpravu všech používaných BDDE. Roztoky potenciálních interferujících látek (kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina močová, močovina, glukóza, sacharóza, kreatinin, kyselina barbiturová, kyselina šťavelová, sulfapyridin, sulfasalazin, KCl, NaCl, Na_3PO_4 , $\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$, FeSO_4 a $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) byly připraveny z vypočítaného množství jejich pevných standardů (vše Sigma-Aldrich nebo Ing. Petr Švec - PENTA, Praha) ve vhodném rozpouštědle (destilovaná voda, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH nebo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HCl). Zásobní roztoky $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ ($\geq 99 \%$, Sigma-Aldrich, Praha) o koncentraci $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním odpovídající navážky pevné látky v roztoku KCl.

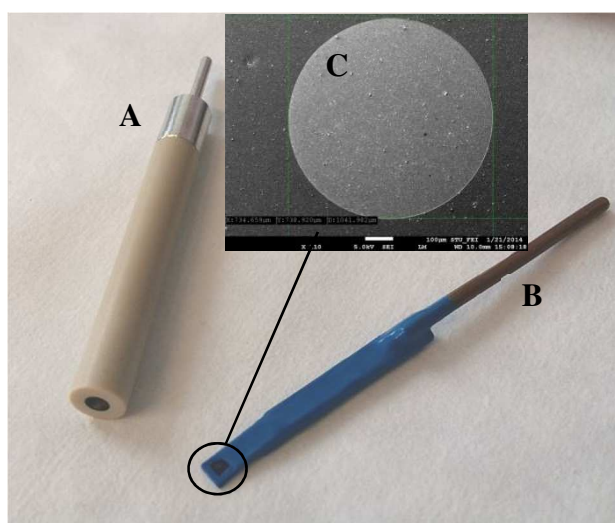
2.2 Přístrojové vybavení

Voltametrická měření byla realizována pomocí Eco-Tribo Polarografu (obrázek 15A, Polaro-Sensors, Praha), který byl řízen počítačem se softwarem POLAR.PRO (verze 5.1),

nebo pomocí Autolabu potenciostatu/galvanostatu – model PGSTAT 12 (obrázek 15B, Metrohm Autolab B.V., Nizozemsko) řízenému počítačem se softwarem NOVA 1.11. Všechna měření byla prováděna v tříelektrodovém uspořádání. Jako pracovní elektroda sloužila komerčně dostupná BDDE (Windsor Scientific, Velká Británie). Výrobce deklaruje u této elektrody poměr B/C v plynné fázi při depozičním kroku 1000 ppm a pracovní povrch $7,07 \text{ mm}^2$. Dále byly použity laboratorně připravené BDDE s pracovním povrchem $0,43 \text{ mm}^2$ a poměrem B/C v plynné fázi 1000, 2000, 4000, 8000, 10 000 a 20 000 ppm (Slovenská technická univerzita v Bratislavě, Slovenská republika). Pro porovnání jsou obě varianty BDDE zachyceny na obrázku 16. Jako referentní byla použita nasycená argenchloridová elektroda ($\text{Ag}|\text{AgCl}(\text{KCl, nasyc.})$) a pomocnou elektrodu tvořil Pt drátek (obě Monokrystaly, Turnov). Veškerá měření probíhala za laboratorní teploty ($23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) a za přístupu kyslíku.



Obrázek 15: Eco-Tribo Polarograf (A) a Autolab potenciostat/galvanostat – model PGSTAT 12 (B).



Obrázek 16: Komerčně dostupná (A) a laboratorně vyrobená (B) BDDE, SEM snímek pracovní plochy (C).

Hodnoty pH roztoků byly měřeny s využitím pH metru Accumet AB150 (Fisher Scientific, Česká republika). K navažování chemikálií sloužily analytické váhy (Kern, Česká republika) a pro usnadnění rozpouštění některých látek byla použita ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex (Schalltec GmbH, Německo). Dávkování roztoků bylo zajištěno pomocí automatických mikropipet Biohit (Biohit PLC, Helsinky). Obrázky ze SEM byly získány s využitím skenovacího elektronového mikroskopu JOEL JSM-7500F. Ramanova spektra byla měřena pomocí konfokálního systému ISA Dilor-Jobin-Yvon-Spex LabRAM s laserem He-Ne o vlnové délce 632 nm. Elektrochemická impedanční spektroskopie byla realizována s využitím potenciostatu PGSTAT302N + FRA2 řízeném počítačem se softwarem NOVA 1.10 (Metrohm Autolab B.V., Nizozemsko).

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Příprava BDDE k měření

Jak již bylo výše uvedeno, laboratorně připravované BDDE s různým poměrem B/C pocházely z Ústavu elektroniky a fotoniky Slovenské technické univerzity v Bratislavě. Pro přípravu těchto elektrod byla použita metoda CVD s využitím reaktoru se žhavenými vlákny. Depozice filmu trvala 4 hodiny. Jako substrát pro depozici diamantového filmu sloužila destička (n-typ Si(100)) s tenkou vrstvou (2 μm) SiO_2 (CVD, Oxford PlasmaLab 80). Substrát byl po opláchnutí isopropanolem a destilovanou vodou ponořen do ultrazvukové lázně obsahující diamantový prášek (< 10 nm, CAS: 7782-40-3, Sigma-Aldrich). Dopování borem bylo zajištěno přidávkem trimethylboranu do směsi plynů CH_4 a H_2 . Poměr CH_4/H_2 byl 1 %. Poměr B/C v plynné fázi byl měněn od 1000 do 20 000 ppm. Tlak při depozici byl 3000 Pa a teplota byla 650 ± 20 °C.

Komerční BDDE i laboratorně připravované elektrody s různým obsahem boru byly před vlastním měřením vždy aktivovány. V případě analýzy LIN a 5-ASA byla na začátku každého pracovního dne v roztoku $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ aplikována nejprve anodická předúprava povrchu pracovní elektrody vložení anodického potenciálu (E_a) +3000 mV po dobu 60 s, která sloužila k očištění elektrodového povrchu. Následovala katodická předúprava elektrody, kdy byl vkládán katodický potenciál (E_k) -3000 mV po dobu 300 s. Takto připravená elektroda byla používána bez dalších úprav a mezi jednotlivá měření nebyl vkládán žádný regenerační nebo aktivační krok. Při měření léčiva LV byly opět všechny testované BDDE aktivovány v $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, kdy byl na elektrodu vkládán nejprve E_k

-2000 mV po dobu 60 s a poté byl zařazen E_a +2000 mV opět po dobu 60 s. Dále bylo proměřeno 20 cyklických voltamogramů mezi potenciály -1000 a +2000 mV rychlostí polarizace (ν) 100 mV s⁻¹ pro ustálení odezvy elektrody. Mezi jednotlivými měřeními byl na elektrodu vkládán potenciál +2000 mV po dobu 5 s. Tímto krokem byl zajištěn O-terminovaný povrch elektrody. Stejný postup aktivace jako v případě LV byl použit rovněž při studiích s využitím redoxních systémů $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ a $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$.

2.3.2 Voltametrická měření

Pro studium voltametrického chování vybraných bioaktivních látek na komerční BDDE byla použita CV. Měření probíhala v rozsahu potenciálů -500 - +2200 mV (LIN), 0 - +2200 mV (5-ASA), a -1000 - +2000 mV (LV) rychlostí polarizace 100 mV s⁻¹, resp. 25 - 500 mV s⁻¹ (LIN, LV) a 10 - 400 mV s⁻¹ (5-ASA) při studiu vlivu ν . Pro vývoj metody stanovení LIN na BDDE byla použita DPV v prostředí BRB o pH 2 s optimalizovanými parametry $E_{\text{poč}} = +400$ mV, $E_{\text{kon}} = +1600$ mV, $\nu = 50$ mV s⁻¹, výška pulzu = 70 mV, šířka pulzu = 20 ms. Pro vývoj metody stanovení 5-ASA v kombinaci s BDDE byla použita SWV s optimalizovanými parametry $E_{\text{poč}} = 0$ mV, $E_{\text{kon}} = +2200$ mV, potenciálový krok = 7 mV, $A = 70$ mV, $f = 25$ Hz v prostředí BRB o pH 7. Poslední studovanou látkou byl LV. Po optimalizaci parametrů DPV byly pro všechna další měření na všech použitých pracovních elektrodách nastaveny následující hodnoty: $E_{\text{poč}} = -700$ mV, $E_{\text{kon}} = +1800$ mV, $\nu = 40$ mV s⁻¹, šířka pulzu = 20 ms a výška pulzu = 50 mV v prostředí BRB o pH 3.

Povrch BDD filmů s poměrem B/C 1000, 2000, 4000, 8000, 10 000 a 20 000 ppm byl charakterizován s využitím SEM a Ramanovy spektroskopie. Ramanova spektra byla zaznamenána při vlnové délce 632 nm. Pro elektrochemickou charakterizaci BDDE s různým obsahem boru byla využívána EIS a CV reverzibilních redoxních systémů $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$. EIS byla měřena s následujícími parametry: frekvence 0,1 – 100 kHz a amplituda signálu 10 mV, $c([\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}) = 2,5$ mmol L⁻¹, elektrolyt 0,1 mol L⁻¹ KCl. Pro CV byly nastaveny parametry měření v rozsahu $E_{\text{poč}} = -1600$ mV až $E_{\text{obratu}} = +1800$ mV při $\nu = 100$ mV s⁻¹. Jako základní elektrolyt byl použit 0,1 mol L⁻¹ KCl a koncentrace obou analytů byla 2,5 mmol L⁻¹. Při měření závislostí na rychlosti polarizace se ν postupně měnila následujícím způsobem: 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400 a 500 mV s⁻¹. Ze získaných měření byly vyhodnocovány rozdíly potenciálů anodického a katodického píku (ΔE_p), poměry výšek anodického a katodického píku (I_a/I_c), dále byl počítán elektrochemicky aktivní povrch jednotlivých elektrod pomocí Randles-Ševčíkovy rovnice [92] a také zdánlivá rychlostní

konstanta přenosu náboje (k_{app}^0) podle Nicholsona [97]. Podrobněji jsou uvedené výpočty popsány v kapitole 2.3.4 Zpracování dat a výpočty.

2.3.3 Analýza praktických vzorků

Pro ověření navržené metody pro stanovení LIN byl analyzován vzorek říční vody obohacený přídatkem LIN. Vzorek říční vody byl odebrán z potoku Podolka (Barchov, okres Pardubice, Česká republika). Vzorek byl odebrán do polyethylenové (PE) vzorkovnice a byl uchováván v lednici. Přídatkem odpovídajícího množství standardního roztoku LIN do vzorku říční vody byl připraven vzorek o koncentraci herbicidu $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. 10 mL takto připraveného vzorku říční vody bylo přidáno do polarografické nádoby s 1 mL BRB o pH 2 jako základního elektrolytu. Stanovení bylo prováděno metodou standardního přídatku, kdy byly do roztoku přidávány vždy 2 až 3 standardní přídatky standardního roztoku LIN o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Stanovení ve vzorku říční vody bylo opakováno 5×.

Dále byla aplikována vyvinutá metoda SWV pro stanovení 5-ASA v komerčně dostupném farmaceutickém přípravku Pentasa[®]. Zásobní roztok byl připraven z 10 tablet farmaceutického přípravku s deklarovaným obsahem 5-ASA 500 mg/tableta. Tablety byly rozdrceny v hmoždíři, získaný prášek byl převeden do 1000ml baňky a rozpuštěn v $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HCl. Dále byl roztok přefiltrován. 7,7 ml čistého filtrátu bylo převedeno do 25ml baňky a doplněno po rysku destilovanou vodou. Tímto způsobem byla získána koncentrace 5-ASA $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (tato hodnota byla vypočítána na základě deklarovaného množství 5-ASA v tabletě Pentasa[®] výrobcem). Dále bylo 20 μl roztoku přípravku Pentasa[®] přidáno do 20 ml BRB (pH 7) do elektrochemické cely a analyzováno. Pro stanovení 5-ASA byla použita metoda standardního přídatku, kdy bylo přidáváno 20 μl standardního roztoku 5-ASA ($c_{5-ASA} = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$) jako standardní přídatky. Každé voltametrické stanovení bylo opakováno 5×. Navržená metoda SWV byla také využita pro stanovení 5-ASA v lidské moči. Vzorek moči byl získán od dobrovolníka (26 let, nekuřák, žena), který nepodstupoval terapii mesalazinem. Vzorek byl skladován v lednici. Před stanovením nebyla použita žádná předúprava vzorku. 1 ml moči byl převeden do 20ml baňky a doplněn základním elektrolytem BRB (pH 7) po rysku. Takto připravený roztok byl obohacen 5-ASA na konečnou koncentraci $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 5-ASA. Takto připravený vzorek byl převeden do elektrochemické cely a analyzován. Opět byla pro stanovení 5-ASA použita metoda standardního přídatku. Standardní přídatek činil 200 μl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ zásobního roztoku 5-ASA a vždy byly přidávány 2 standardní přídatky. Opět bylo každé stanovení opakováno 5×.

Praktickým vzorkem pro stanovení LV byl farmaceutický přípravek (prášek pro přípravu injekčního roztoku) Leucovorin Ca LACHEMA 10 (Lachema, Brno). Výrobce deklarovaný obsah byl 10 mg LV na 1 ampuli. Roztok byl připraven rozpuštěním obsahu ampule v 1 ml destilované vody (dle pokynů výrobce). Takto připravený roztok obsahoval přibližně $1,955 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ LV (tato hodnota byla vypočítána na základě množství prášku v ampulce deklarovaného výrobcem). Pro výslednou analýzu byl tento roztok 10× naředěn na výslednou koncentraci $c_{LV} = 1,955 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. 10 μl tohoto roztoku bylo přidáváno do polarografické nádoby s 10 ml základního elektrolytu BRB (pH 3). Opět probíhalo stanovení metodou standardního přídatku, kdy bylo přidáváno 20 μl $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ standardního roztoku LV. Každé stanovení bylo opakováno 5×.

2.3.4 Zpracování dat a výpočty

Veškeré grafy byly vytvořeny s využitím softwaru MS Excel 2010 (Microsoft, 2010). Program OriginPro 9 (OriginLab Corporation, USA) byl využit pro výpočet parametrů kalibračních závislostí a intervalů spolehlivosti na hladině významnosti 0,05. Statistické parametry, jako detekční limit (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) byly vypočítány z naměřených koncentračních závislostí jako 3×, resp. 10× směrodatná odchylka úseku podělená směrnici kalibrační přímky.

Elektrochemicky aktivní povrch testovaných BDDE byl počítán ze získaných závislostí výšky píku (I_p) na odmocnině z rychlosti polarizace ($v^{1/2}$) s využitím Randles-Ševčíkovy rovnice (2) [92]:

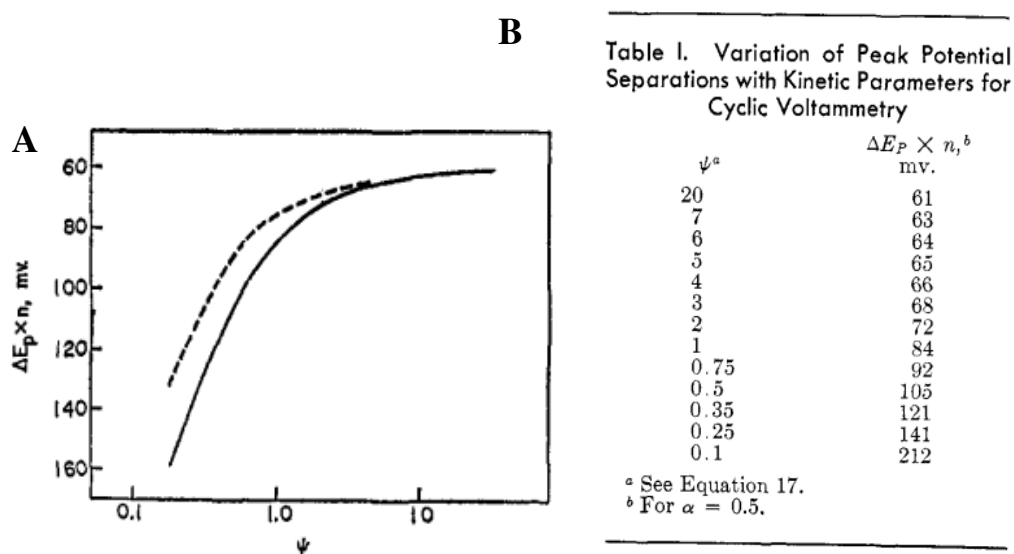
$$I_{pa,c} = 2,69 \cdot 10^5 \cdot A \cdot n^{1,5} \cdot D^{0,5} \cdot v^{0,5}, \quad (2)$$

kde $I_{pa,c}$ je proud anodického a katodického signálu, A je elektrochemicky aktivní plocha elektrody, n je počet vyměňovaných elektronů a D je difuzní koeficient. Pro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ byl použit $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [92] a pro $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ $D = 5,5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [144].

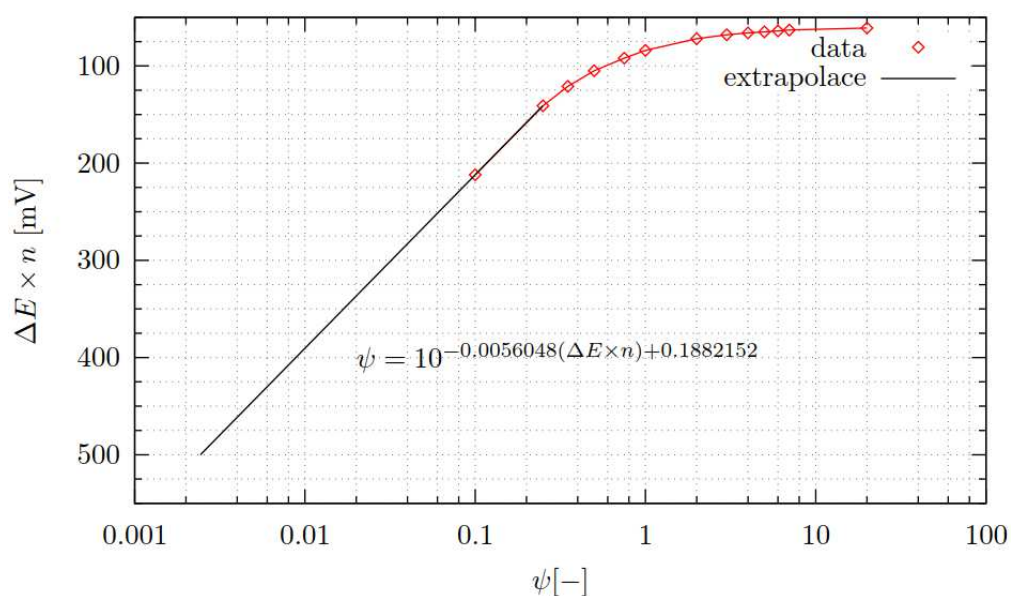
Dále byla počítána zdánlivá rychlostní konstanta přenosu náboje (k_{app}^0) podle Nicholsona [97] (rovnice 1). Pro výpočet byly využity závislost a tabulka uvedené na obrázku 17. Závislost na obrázku 17A představuje $(\Delta E_p \times n)$ vyneseny jako logaritmická funkce Ψ a na obrázku 17B je uvedena tabulka hodnot Ψ a odpovídajících $(\Delta E_p \times n)$ k této závislosti [97]. O reverzibilní reakci se jedná v případě vysokých hodnot Ψ , kde ΔE_p v případě jednoho vyměňovaného elektronu odpovídá 59 mV. Průběh takové reakce je v souladu s Nernstovou rovnicí (3):

$$E = E^0 - (0,059/n) \cdot \log(a_{\text{red}}/a_{\text{ox}}), \quad (3)$$

kde E je potenciál elektrody, E^0 je standardní elektrodový potenciál, n je počet vyměňovaných elektronů, a je aktivita oxidované nebo redukované formy. O ireverzibilní elektrodovou reakci se jedná v případě, že se Ψ blíží hodnotě 0. Pro nízké hodnoty Ψ podle Nicholsona platí, že uvedená závislost pokračuje lineárně [97]. V této disertační práci byl pro odečet hodnot Ψ sestrojen graf, který je zobrazen na obrázku 18. Součástí obrázku je i rovnice, která odpovídá uvedenému lineárnímu průběhu závislosti získaná extrapolací pro odečet nízkých hodnot Ψ (pro velké hodnoty $(\Delta E_p \times n)$).



Obrázek 17: Graf závislosti $(\Delta E_p \times n)$ na Ψ (A) a příslušné hodnoty $(\Delta E_p \times n)$ a Ψ (B) [97].



Obrázek 18: Sestrojený graf závislosti $(\Delta E_p \times n)$ na ψ včetně extrapolace pro nízké hodnoty ψ .

3 Výsledky a diskuze

Následující kapitoly této disertační práce jsou věnovány studiu elektrochemických vlastností a praktickému využití BDDE. Jak již bylo výše popsáno, tento typ pracovní elektrody má velmi široké potenciálové okno a umožňuje tak sledování oxidačních i redukčních reakcí. Nejprve byla použita komerčně dostupná elektroda pro studium voltametrického chování vybraných bioaktivních látek, konkrétně herbicidu linuronu a léčiv mesalazinu a leukovorinu, a pro vývoj metod jejich stanovení. Další kapitoly jsou zaměřeny na laboratorně připravené BDDE s různým poměrem B/C a jejich vlastnosti. Nakonec byly testovány aplikační možnosti těchto elektrod v elektroanalytické oblasti při stanovení výše uvedených látek a dosažené výsledky byly porovnány v souvislosti s obsahem boru v diamantovém filmu.

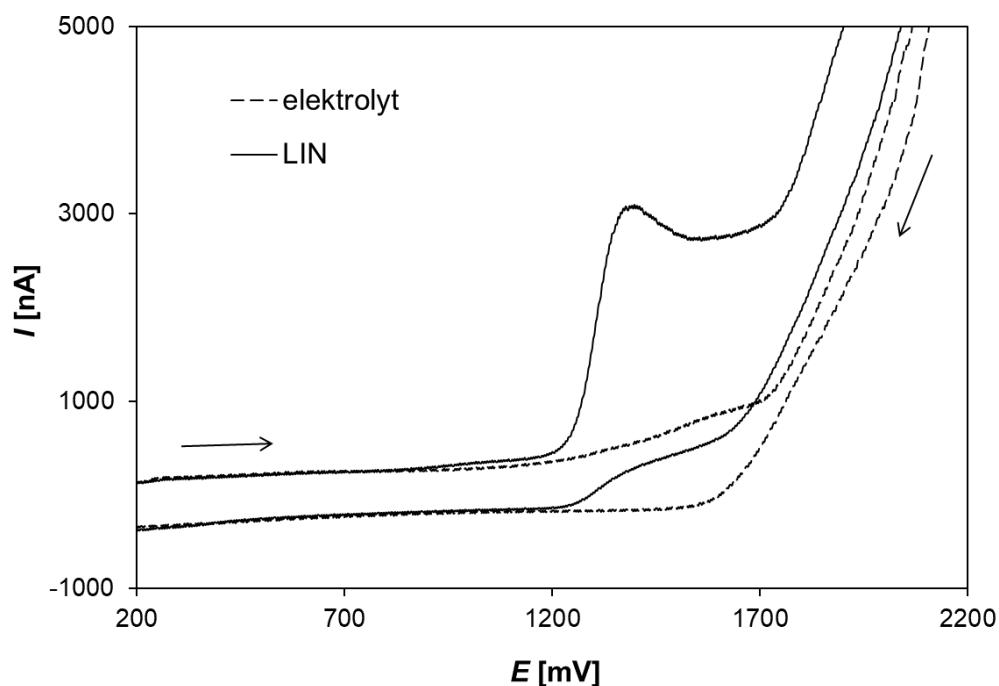
3.1 Studium voltametrického chování vybraných bioaktivních látek na BDDE a vývoj metod jejich stanovení

Komerčně dostupná BDDE byla použita pro studium voltametrického chování linuronu, mesalazinu a leukovorinu v závislosti na pH prostředí a rychlosti polarizace. Poté byla vybrána vhodná metoda pro stanovení jednotlivých látek, optimalizovány její parametry a z následujících měření byly vypočteny základní statistické parametry, jako např. lineární dynamický rozsah metody (LDR), LOD, RSD apod. Na závěr byly analyzovány reálné vzorky přírodních vod, farmaceutických přípravků nebo moči. Podrobný průběh těchto studií je demonstrován na příkladu LIN. Pro další dvě látky byl postup obdobný, ale výsledky jsou shrnuty stručněji.

3.1.1 Linuron

3.1.1.1 Studium voltametrického chování linuronu

Nejprve byl změřen cyklický voltamogram LIN o koncentraci $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na BDDE v prostředí BRB o pH 2. Tato hodnota byla převzata z literatury [120]. Měření probíhalo od počátečního potenciálu ($E_{\text{poč}}$) -500 mV do potenciálu obratu (E_{obratu}) $+2200 \text{ mV}$ při rychlosti polarizace (v) 100 mV s^{-1} . Získaný voltamogram je uveden na obrázku 19. Bylo zjištěno, že LIN poskytuje na BDDE jeden významný oxidační signál kolem potenciálu (E_p) $+1250 \text{ mV}$. Na katodické křivce nebyla zaznamenána žádná odpovídající redukční proudová odezva a jedná se tedy o chemicky ireverzibilní elektrodovou reakci.



Obrázek 19: Cyklický voltamogram LIN zaznamenaný na BDDE. Metoda CV, elektrolyt BRB (pH 2), $E_{\text{poč}} = -500 \text{ mV}$, $E_{\text{obratu}} = +2200 \text{ mV}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $c_{\text{LIN}} = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Pro upřesnění charakteru probíhající elektrodové reakce byl studován vliv rychlosti polarizace na tvar a polohu voltametričeského signálu LIN. Měřeno bylo metodou DC voltametrie v prostředí BRB o pH 2 v rozsahu potenciálů od -500 mV do $+1900 \text{ mV}$. Rychlost polarizace byla postupně měněna od 25 do 500 mV s^{-1} po 25 mV s^{-1} . V polarografické nádobce byla vždy koncentrace LIN $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Na obrázku 20 jsou uvedeny získané voltametričeské křivky. Z obrázku je zřejmé, že výška oxidačního signálu LIN rostla se zvyšující se rychlostí polarizace. Současně docházelo k posunu píku k pozitivnějším potenciálům, což odpovídá ireverzibilnímu průběhu elektrodové reakce.

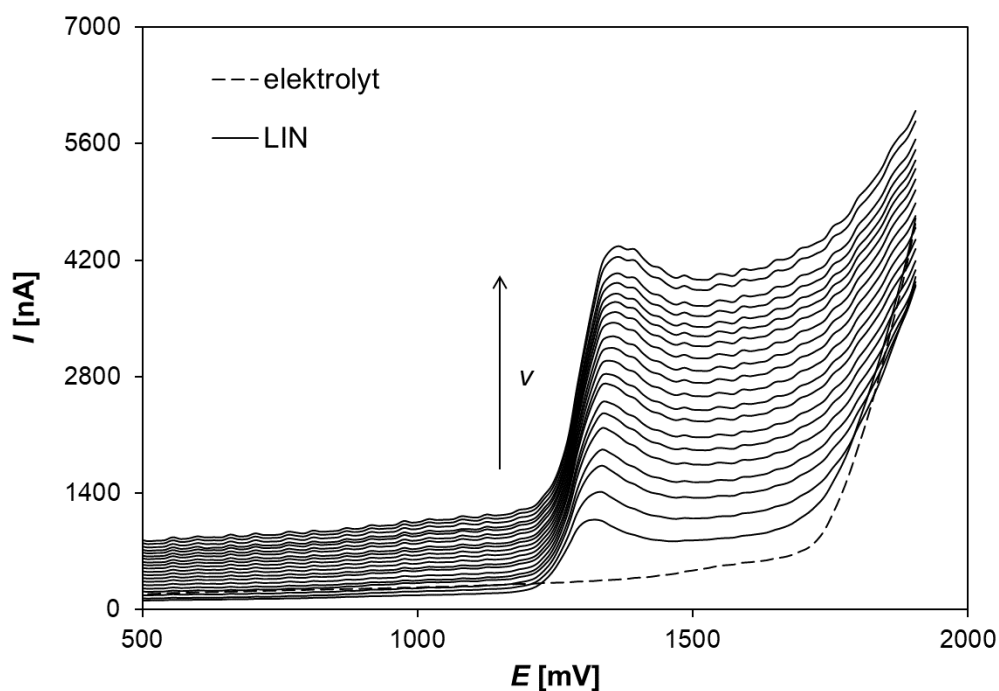
Jednotlivé závislosti výšky signálu LIN na rychlosti polarizace jsou uvedeny na obrázku 21. Z obrázku 21A vyplývá, že výška signálu neroste s rychlostí polarizace lineárně a je tedy možné říci, že reakce není řízena adsorpcí. Následně byla vynesena závislost výšky píku na odmocnině z rychlosti polarizace (obrázek 21B), kterou lze považovat za lineární. Tato závislost může být popsána následující rovnicí (4) s příslušným korelačním koeficientem:

$$I_p [\text{nA}] = (124,7 \pm 1,5) \cdot \nu^{1/2} [\text{mV}^{1/2} \text{ s}^{-1/2}] + (178 \pm 24), r = 0,9987. \quad (4)$$

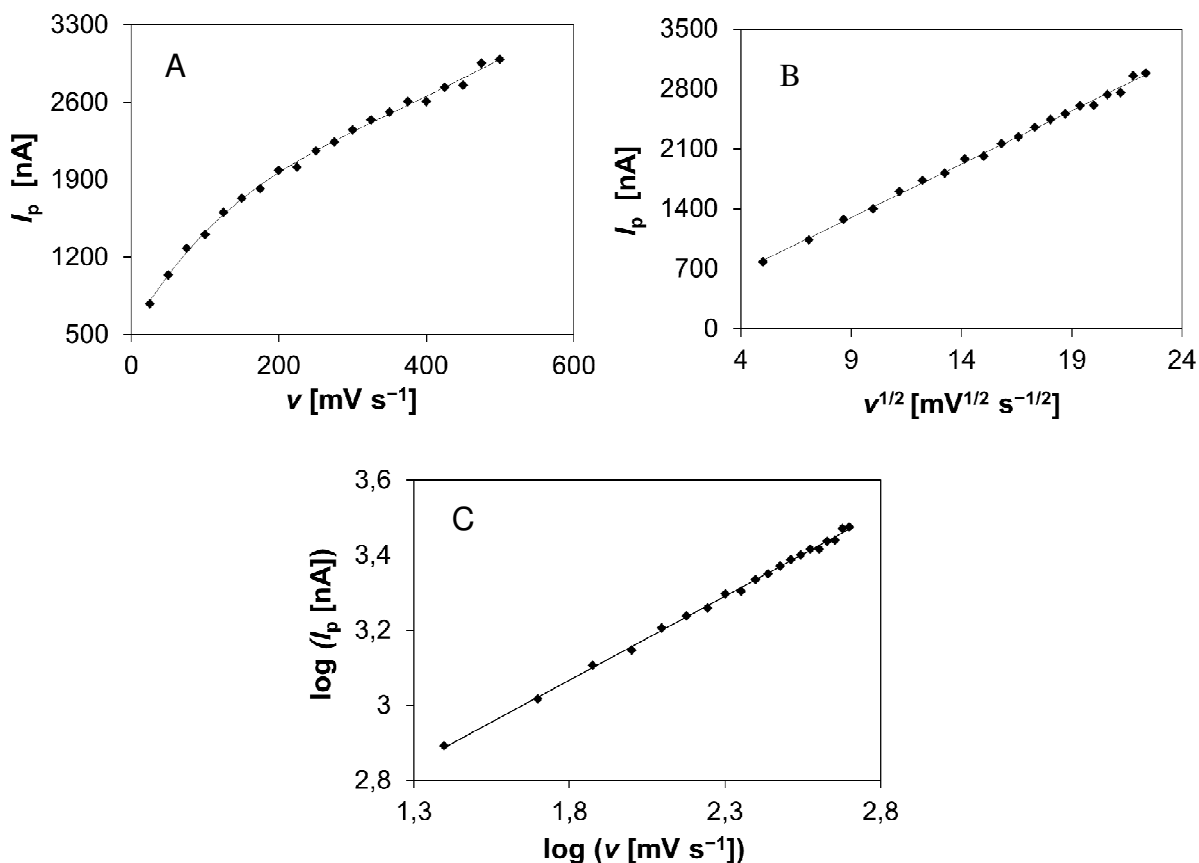
Lineární průběh uvedené závislosti svědčí o difuzí řízené elektrodové reakci. Pro upřesnění řídicího procesu byla vynesena také logaritmická závislost $\log(I_p)\text{-}\log(v)$, která je uvedena na obrázku 21C a je popsána rovnicí (5) s příslušným korelačním koeficientem:

$$\log(I_p [\text{nA}]) = (0,4466 \pm 0,0042) \cdot \log(v [\text{mVs}^{-1}]) + (2,2637 \pm 0,0098), r = 0,9992. \quad (5)$$

Pro logaritmickou závislost výšky píku na rychlosti polarizace je důležitá zejména hodnota směrnice. Pokud se tato hodnota blíží 0,5, jedná se o difuzně řízenou elektrodovou reakci. Pokud se hodnota směrnice blíží jedné, jde o adsorpčně řízenou reakci, a pokud se hodnota směrnice blíží nule, jedná se o kineticky řízenou reakci. V případě oxidačního signálu LIN je hodnota směrnice 0,4466. Jedná se tedy o difuzně řízenou elektrodovou reakci s možným vlivem kinetiky.



Obrázek 20: DC voltamogramy LIN v závislosti na rychlosti polarizace zaznamenané na BDDE. Metoda DCV, elektrolyt BRB (pH 2), $E_{\text{poč}} = -500$ mV, $E_{\text{kon}} = +1900$ mV, $v = 25\text{-}500$ mV s⁻¹, $c_{\text{LIN}} = 5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

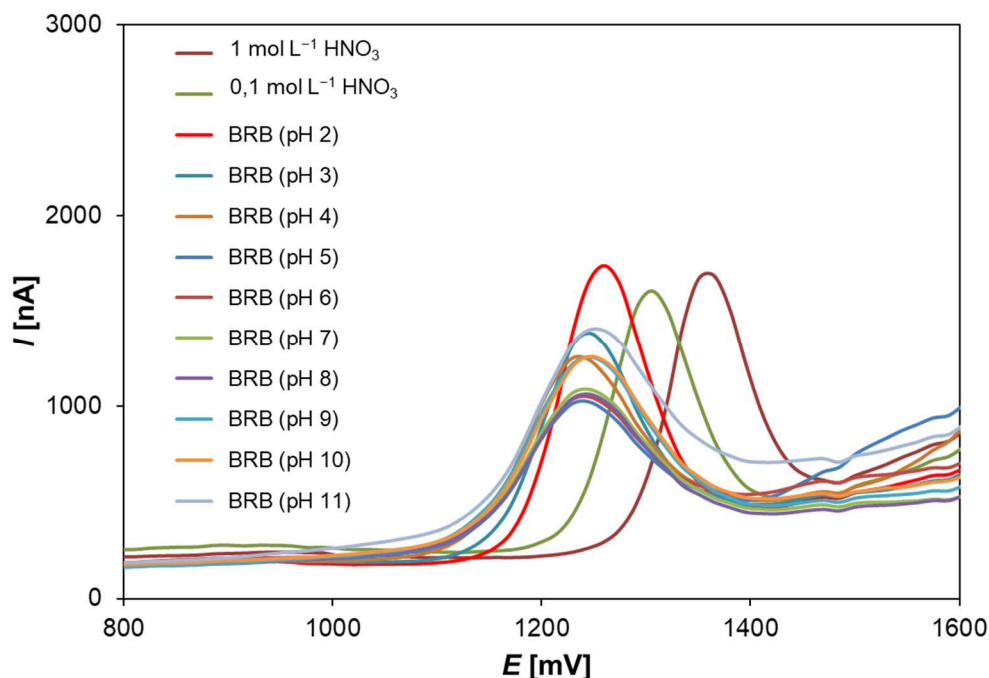


Obrázek 21: Závislosti výšky píku na rychlosti polarizace (A), odmocnině z rychlosti polarizace (B) a logaritmická závislost výšky píku na rychlosti polarizace (C) získané na BDDE. Metoda DCV, elektrolyt BRB (pH 2), $E_{\text{poč}} = -500$ mV, $E_{\text{kon}} = +1900$ mV, $v = 25$ -500 mV s⁻¹, $c_{\text{LIN}} = 5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

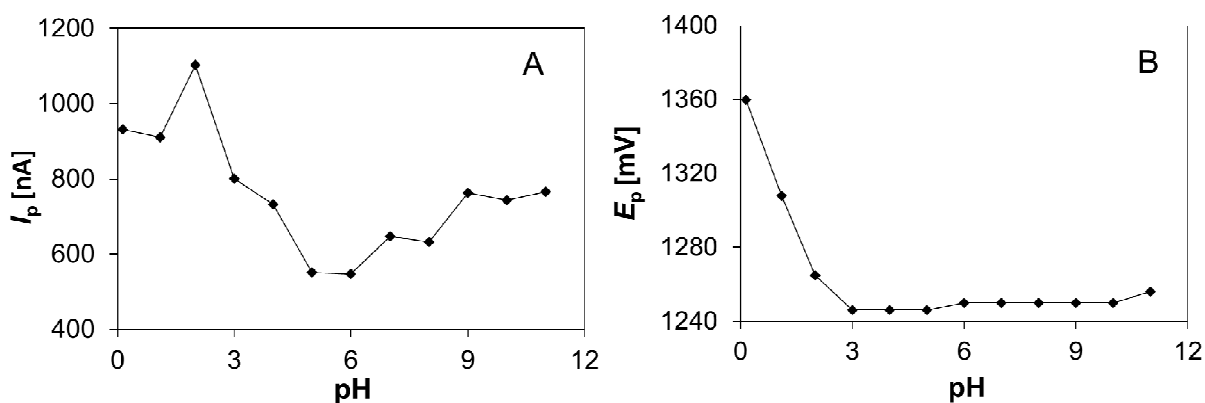
3.1.1.2 Vývoj voltametrické metody stanovení linuronu

Vzhledem k vyšší proudové odezvě oproti SWV byla pro stanovení LIN v modelových roztocích vybrána v kombinaci s BDDE metoda DPV. Prvním krokem bylo ověření volby pH základního elektrolytu pro stanovení LIN. Jako základní elektrolyt byly použity roztoky HNO₃ o koncentraci 1 a 0,1 mol L⁻¹ pro zajištění silně kyselého prostředí a dále roztoky BRB v rozsahu pH 2-11. Koncentrace LIN byla 5×10⁻⁵ mol L⁻¹, $E_{\text{poč}} -500$ mV, $E_{\text{kon}} +2000$ mV, v 25 mV s⁻¹, výška pulzu +50 mV a šířka pulzu +80 ms. Oxidační signál LIN byl pozorován v celém testovaném rozsahu pH, jak je vidět na obrázku 22. Je zřejmé, že nejvyšší a nejostřejší byl pík v silně kyselém prostředí. Na obrázku 23A je zobrazena závislost výšky píku (I_p) na pH, z níž je patrné, že maxima dosáhl pík LIN v prostředí BRB o pH 2. Poté docházelo k poklesu signálu a v alkalickém prostředí se již jeho výška příliš neměnila. S rostoucím pH také docházelo k postupnému rozšiřování píku a k jeho posunu k negativnějším potenciálům (obrázek 22). Od pH 3 se již poloha píku v podstatě neměnila

(obrázek 23B). Pro veškerá další měření byl jako vhodný základní elektrolyt vybrán BRB o pH 2. V tomto prostředí byla pozorována nejvyšší proudová odezva LIN, pík byl ostrý a tedy velmi dobře vyhodnotitelný.

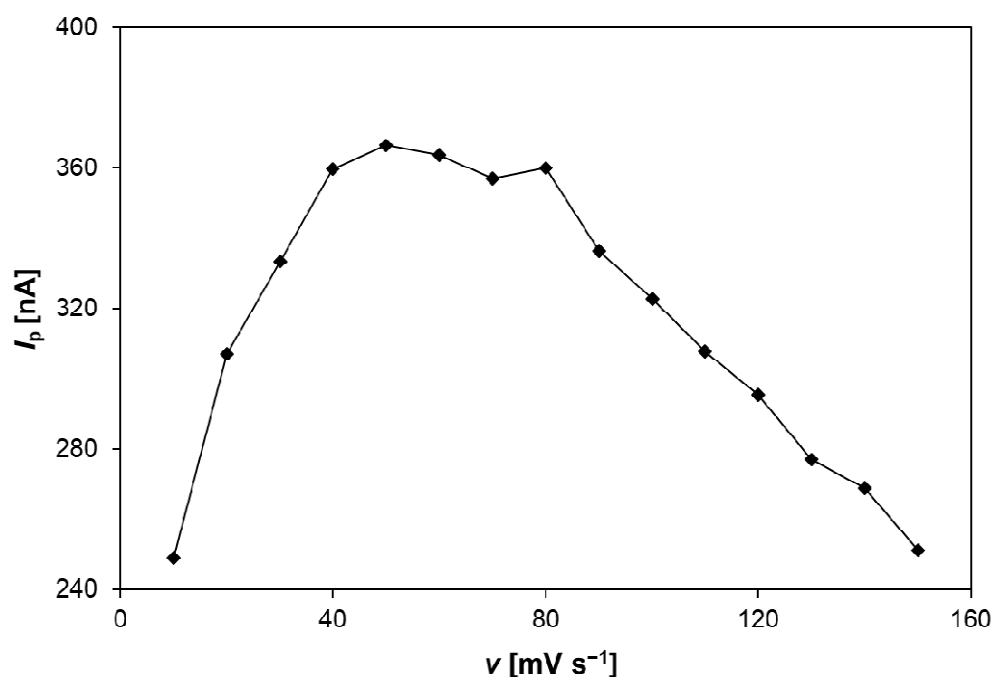


Obrázek 22: DP voltamogramy LIN v závislosti na pH zaznamenané na BDDE. Metoda DPV, elektrolyt HNO₃ (1 a 0,1 mol L⁻¹), BRB (pH 2-11), $E_{poč} = -500$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $\nu = 25$ mV s⁻¹, výška pulzu = 50 mV, šířka pulzu = 80 ms, $c_{LIN} = 5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.



Obrázek 23: Závislosti výšky píku (A) a potenciálu píku (B) na pH získané na BDDE. Metoda DPV, elektrolyt HNO₃ (1 a 0,1 mol L⁻¹), BRB (pH 2-11), $E_{poč} = -500$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $\nu = 25$ mV s⁻¹, výška pulzu = 50 mV, šířka pulzu = 80 ms, $c_{LIN} = 5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

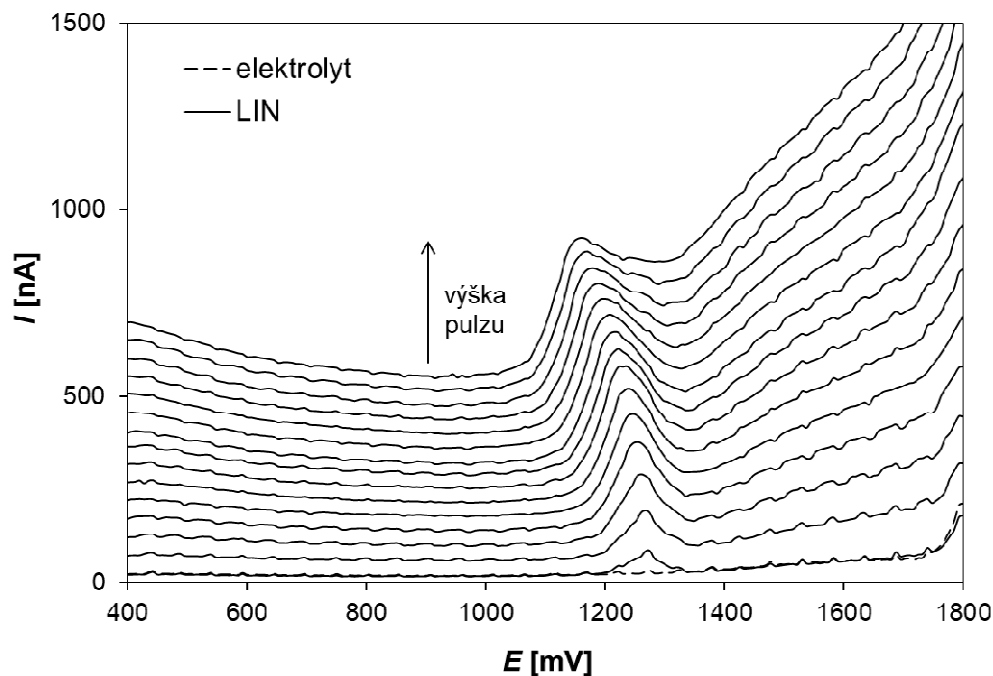
V rámci optimalizace parametrů DPV pro stanovení LIN byly testovány rychlost polarizace a výška, resp. šířka potenciálového pulzu. Při všech následujících experimentech byla koncentrace LIN vždy $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a měření probíhalo opět v BRB o pH 2. Prvním testovaným parametrem byla rychlost polarizace. Výška pulzu byla při tomto měření nastavena na 50 mV a šířka pulzu na 80 ms. Rychlost polarizace byla postupně měněna od 10 do 150 mV s^{-1} po 10 mV s^{-1} . Na obrázku 24 je zobrazena závislost I_p LIN na ν . Z uvedené závislosti vyplývá, že pík LIN rostl se zvyšující se ν až do hodnoty 50 mV s^{-1} . S dalším zvyšováním rychlosti polarizace, již docházelo ke snižování a rozšiřování proudové odezvy. Pro další měření byla zvolena rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , při které byla zaznamenána nejvyšší proudová odezva analytu, a pík byl dobře vyhodnotitelný.



Obrázek 24: Závislosti výšky píku na rychlosti polarizace zaznamenaná na BDDE. Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 2), $E_{\text{poč}} = +200 \text{ mV}$, $E_{\text{kon}} = +1900 \text{ mV}$, $\nu = 10\text{-}150 \text{ mV s}^{-1}$, výška pulzu = 50 mV, šířka pulzu = 80 ms, $c_{\text{LIN}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Dalším testovaným parametrem byla výška pulzu. Ta byla měněna od 10 do 150 mV po 10 mV. Rychlost polarizace byla 50 mV s^{-1} a šířka pulzu 80 ms. Záznam získaných DP voltamogramů je uveden na obrázku 25. Z něj i ze závislosti I_p na výšce pulzu (obrázek 26A) vyplývá, že se zvyšující se výškou pulzu až do hodnoty 80 mV docházelo ke zvyšování

proudové odezvy LIN. Od hodnoty 80 mV již signál LIN nenarůstal a docházelo k jeho deformaci. Pro následující měření byla vybrána výška pulzu 70 mV.



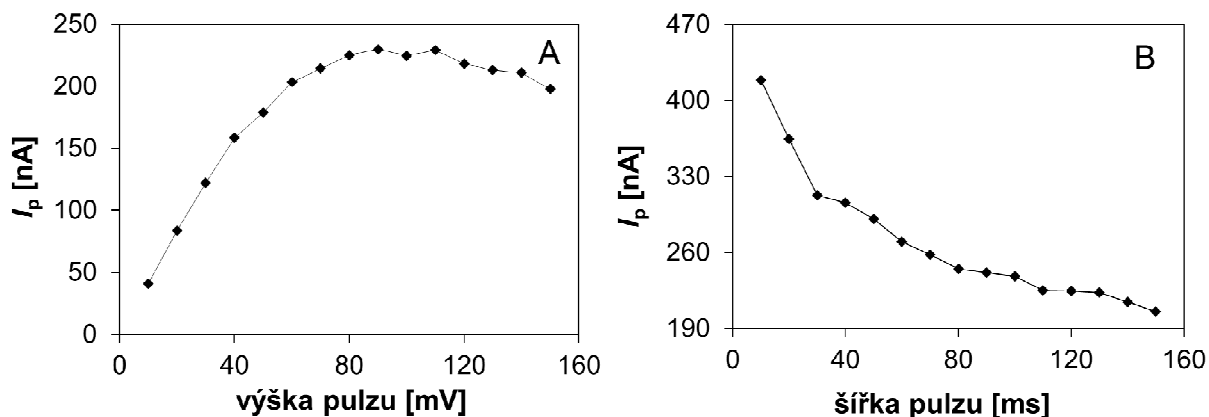
Obrázek 25: DP voltamogramy LIN v závislosti na výšce pulzu zaznamenané na BDDE. Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 2), $E_{\text{poč}} = +200$ mV, $E_{\text{kon}} = +1900$ mV, $\nu = 50$ mV s⁻¹, výška pulzu = 10-150 mV, šířka pulzu = 80 ms, $c_{\text{LIN}} = 1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Na závěr byla měřena závislost I_p na šířce pulzu. Rychlost polarizace byla 50 mV s⁻¹, výška pulzu 70 mV a šířka pulzu byla měněna od 10 do 150 ms po 10 ms. Ze závislosti I_p na šířce pulzu, která je uvedena na obrázku 26B vyplývá, že se proudová odezva LIN se zvyšující se šířkou pulzu postupně snižovala. Jako optimální byla pro veškerá další měření vybrána hodnota 20 ms, která představuje klidovou dobu pulzu předcházející další 20 ms, během nichž probíhal odečet proudu.

DPV s nastavenými optimalizovanými parametry se spojení s BDDE byla následně použita při měření koncentračních závislostí LIN v modelových roztocích. Konkrétní hodnoty všech parametrů měření jsou uvedeny pod obrázkem 27, který představuje příklad koncentrační závislosti v rozsahu od $5,0 \times 10^{-6}$ do $4,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ LIN. Z vložené závislosti I_p na c je zřejmé, že výška sledovaného proudového signálu rostla se zvyšující se koncentrací LIN v roztoku lineárně (rovnice (6)).

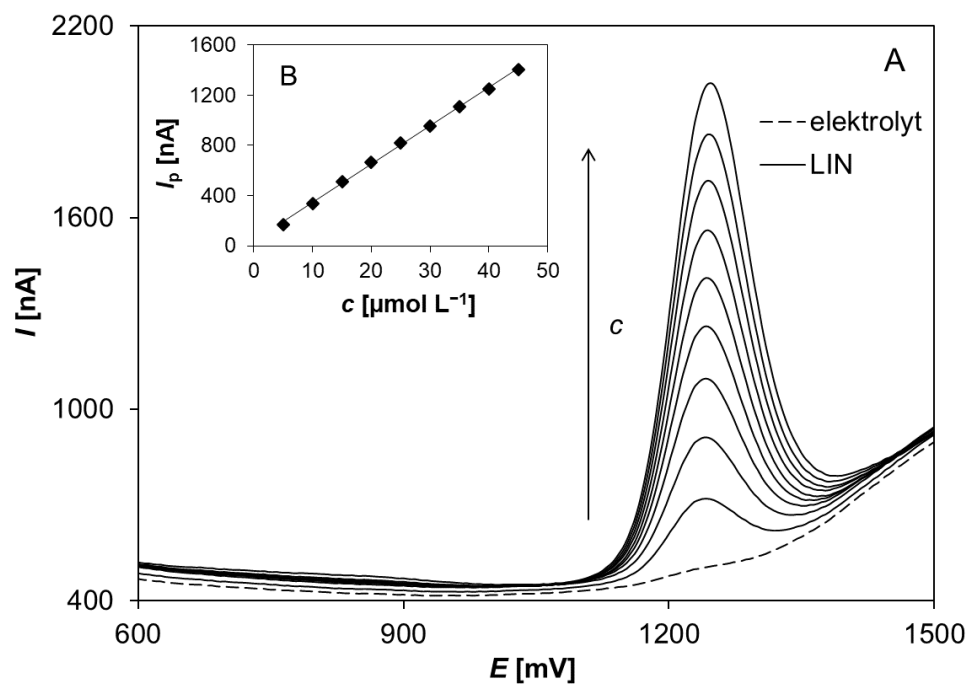
$$I_p [\text{nA}] = (30,51 \pm 0,38) \cdot c [\mu\text{mol L}^{-1}] + (39 \pm 11), r = 0,9994 \quad (6)$$

Ze získaných koncentračních závislostí byl zjištěn LDR, který činí $5,0 \times 10^{-7}$ - $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Hodnoty LOD a LOQ byly vypočteny z nejnižší proměřené koncentrační závislosti ($5,0 \times 10^{-7}$ - $3,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), a to LOD $1,4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a LOQ $4,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

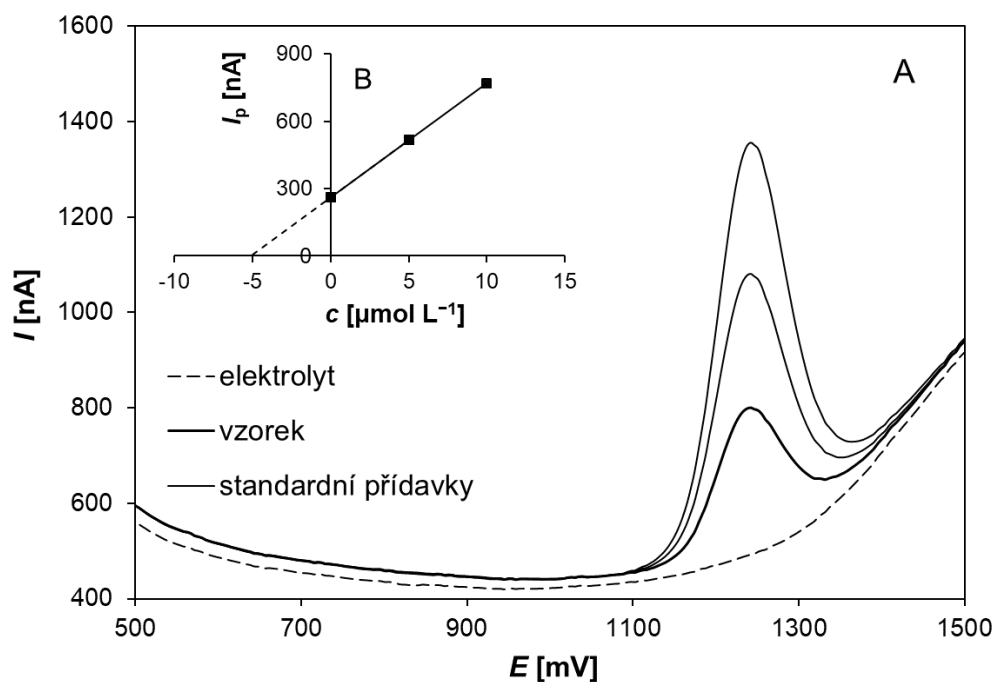


Obrázek 26: Závislosti výšky píku na výšce (A) a šířce pulzu (B) zaznamenané na BDDE. Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 2), $E_{\text{poč}} = +200 \text{ mV}$, $E_{\text{kon}} = +1900 \text{ mV}$, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, výška pulzu = 10-150 mV (A), 70 mV (B), šířka pulzu = 80 ms (A), 10-150 ms (B), $c_{\text{LIN}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Dále byla testována opakovatelnost měření LIN na BDDE. Koncentrace LIN byla $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a bylo změřeno 11 opakovaných křivek. Ze získaných výšek signálu LIN byla vypočítána relativní směrodatná odchylka opakovaného měření ($\text{RSD}_{\text{M}(11)}$) 0,84 %, která svědčí o velmi dobré opakovatelnosti měření. V dalším kroku byla ověřena správnost a opakovatelnost stanovení LIN v modelových roztocích navrženou metodou. Pro tři různé koncentrace LIN bylo provedeno vždy 5 opakovaných stanovení s využitím metody standardního přídávku, kdy byly přidány vždy 2-3 přídávky standardního roztoku LIN o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Z těchto stanovení byla vypočtena relativní směrodatná odchylka opakovaného stanovení ($\text{RSD}_{\text{s}(5)}$), průměrná hodnota koncentrace LIN s odpovídajícím intervalem spolehlivosti na hladině významnosti 0,05 a výtěžnost. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 4. Z té vyplývá, že stanovení LIN s využitím metody DPV v kombinaci s BDDE jako pracovní elektrodou je správné a velmi dobře opakovatelné. Příklad stanovení LIN v modelovém roztoku o koncentraci $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ je uveden na obrázku 28 včetně grafického vyhodnocení metody standardního přídávku.



Obrázek 27: DP voltamogramy LIN v závislosti na koncentraci zaznamenané na BDDE (A), závislost výšky píku na koncentraci (B). Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 2), $E_{\text{poč}} = +400$ mV, $E_{\text{kon}} = +1600$ mV, $\nu = 50$ mV s $^{-1}$, výška pulzu = 70 mV, šířka pulzu = 20 ms, $c_{\text{LIN}} = 5,0 \times 10^{-6}$ - $4,5 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$.



Obrázek 28: Stanovení LIN v modelovém roztoku o koncentraci 5×10^{-6} mol L $^{-1}$ zaznamenané na BDDE (A) a grafické vyhodnocení metody standardního přídávky (B). Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 2), $E_{\text{poč}} = +400$ mV, $E_{\text{kon}} = +1600$ mV, $\nu = 50$ mV s $^{-1}$, výška pulzu = 70 mV, šířka pulzu = 20 ms, standardní přídávky: $V = 50$ μl , $c_{\text{LIN}} = 1 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$.

Tabulka 4 Výsledky opakovaných stanovení LIN v modelových roztocích

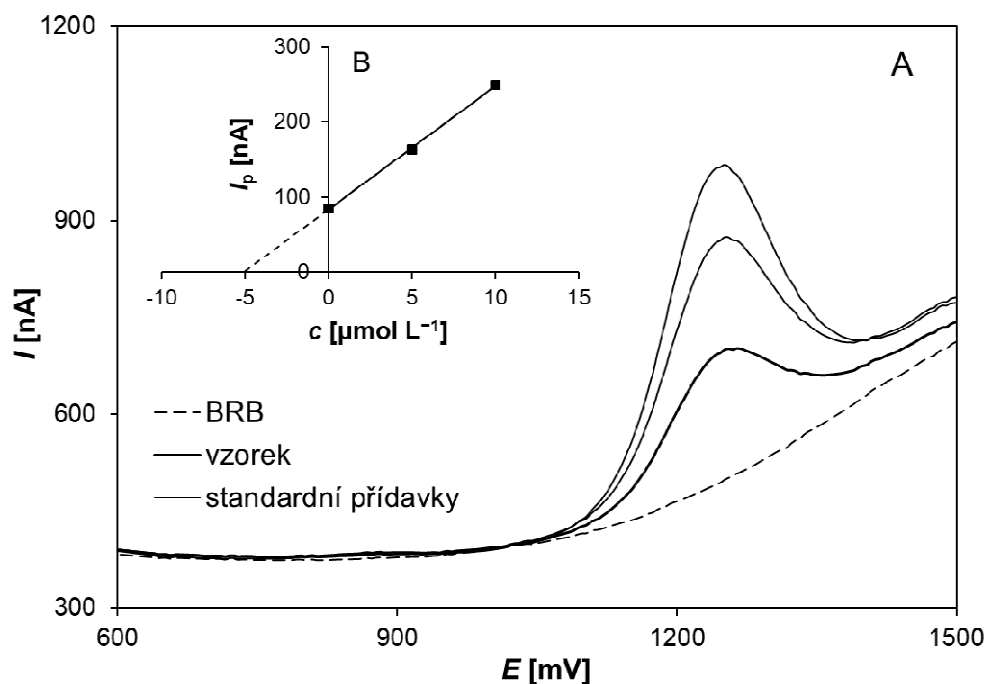
Dáno [mol L ⁻¹]	Stanoveno [mol L ⁻¹]	Výtěžnost [%]	RSD_s(5) [%]
1,0×10 ⁻⁵	(1,020±0,030)×10 ⁻⁵	95,5-103,0	1,49
5,0×10 ⁻⁶	(5,000±0,012)×10 ⁻⁶	99,6-100,4	0,36
2,5×10 ⁻⁶	(2,500±0,015)×10 ⁻⁶	99,2-101,2	0,91

Analýza praktického vzorku

V závěru této studie byla navržená metoda aplikována při analýze praktického vzorku říční vody, který byl obohacený o přídavek LIN na výslednou koncentraci 5×10⁻⁶ mol L⁻¹. Postup přípravy vzorku je uveden v experimentální části v kapitole 2.3. Vzorek říční vody byl pořízen z potoku Podolka nedaleko města Pardubic. Vzorek byl analyzován metodou standardního přídavku a byl analyzován 5×. Příklad analýzy říční vody je uveden na obrázku 29 včetně grafického vyhodnocení metody standardního přídavku. Ze získaných opakovaných stanovení byla vypočítána RSD_s(5), průměrná hodnota koncentrace LIN s příslušným intervalem spolehlivosti a výtěžnost. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 5, z níž je zřejmé, že navržená metoda je pro stanovení LIN v praktickém vzorku říční vody umožňuje dosažení správných a dobře opakovatelných výsledků.

Tabulka 5 Výsledky opakovaného stanovení LIN v praktickém vzorku říční vody

Dáno [mol L ⁻¹]	Stanoveno [mol L ⁻¹]	Výtěžnost [%]	RSD_s(5) [%]
5,0×10 ⁻⁶	(5,000±0,015)×10 ⁻⁶	99,6-100,8	0,46

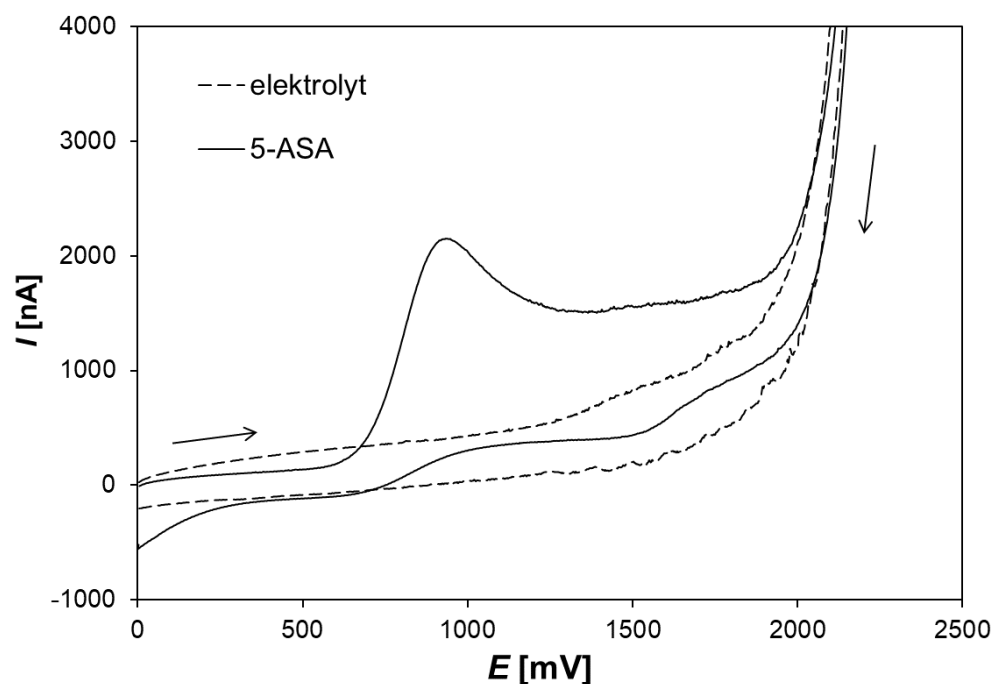


Obrázek 29: Stanovení LIN ve vzorku vody z potoka Podolky metodou standardního přídávku na BDDE (A) a grafické vyhodnocení metody standardního přídávku (B). Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 2), $E_{\text{poč}} = +400$ mV, $E_{\text{kon}} = +1600$ mV, výška pulzu = 70 mV, šířka pulzu = 20 ms, $\nu = 50$ mV s⁻¹, standardní přídávky: $V = 50$ μl , $c_{\text{LIN}} = 1 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

3.1.2 Mesalazin

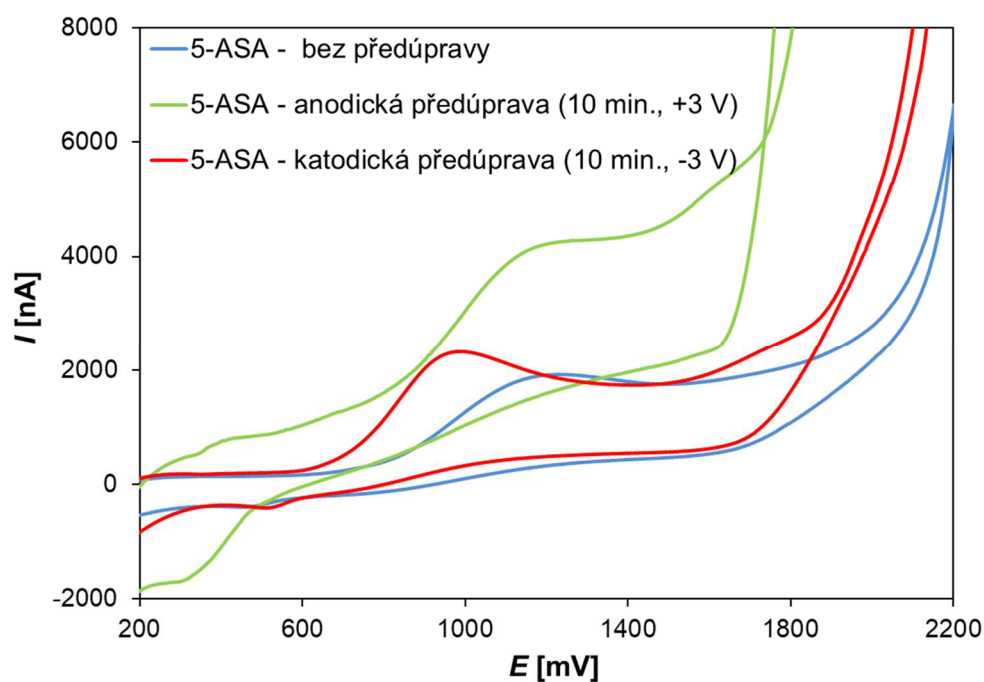
3.1.2.1 Studium voltametrického chování mesalazinu

Stejným způsobem jako bylo studováno voltametrické chování linuronu bylo studováno také voltametrické chování léčiva mesalazinu. Nejprve byl změřen cyklický voltamogram 5-ASA pro zjištění jeho elektrochemického chování. Koncentrace 5-ASA při tomto měření byla 1×10^{-4} mol L⁻¹. Jako základní elektrolyt byl použit BRB o pH 7 a měření probíhalo v rozsahu potenciálů od $E_{\text{poč}} 0$ mV do $E_{\text{obratu}} +2200$ mV při $\nu 100$ mV s⁻¹. Bylo zjištěno, že 5-ASA poskytuje na BDDE jeden dobře vyvinutý oxidační signál okolo $E_p +900$ mV, jak je vidět ze získaného cyklického voltamogramu na obrázku 30. Při použitých pracovních podmínkách nebyl pozorován žádný redukční pík, což opět ukazuje na ireverzibilní elektrodovou reakci. Toto zjištění je také v souladu s výše uvedeným reakčním mechanismem [129].



Obrázek 30: Cyklický voltamogram 5-ASA zaznamenaný na BDDE. Metoda CV, elektrolyt BRB (pH 7), $E_{\text{poč}} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{obratu}} = +2200 \text{ mV}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $c_{5\text{-ASA}} = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Dále byl studován vliv předúpravy povrchu pracovní elektrody na voltametričnou odezvu 5-ASA. Měřeno bylo metodou CV v prostředí BRB o pH 7. Koncentrace 5-ASA byla při těchto experimentech $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Nejprve byla změřena křivka po přidavku 5-ASA bez jakékoliv předúpravy pracovního povrchu elektrody. Poté byl studován vliv anodické předúpravy BDDE, kdy byl na elektrodu vkládán potenciál +3000 mV po dobu 10 minut a opět byl na O-terminovaném povrchu elektrody změřen cyklický voltamogram. Nakonec byl studován vliv katodické předúpravy, kdy byl vkládán potenciál -3000 mV rovněž po dobu 10 minut a poté byla na H-terminovaném povrchu BDDE změřena křivka. Z obrázku 31 je zřejmé, že voltametričká odezva 5-ASA byla přibližně o 35 % vyšší a signál byl lépe vyvinutý po katodické předúpravě než odezva 5-ASA po anodické předúpravě pracovního povrchu elektrody. Vzhledem k získaným výsledkům byla pro veškerá následující měření vybrána anodická předúprava +3000 mV po dobu 60 s, která sloužila k oxidaci případných nečistot na povrchu elektrody, následovaná významnější katodickou předúpravou -3000 mV po dobu 300 s. Tímto postupem byl získán H-terminovaný povrch elektrody. Tento postup předúpravy povrchu pracovní elektrody byl aplikován vždy na začátku pracovního dne. Později se ukázalo, že v průběhu měření již není nutné elektrodu nijak upravovat nebo regenerovat a ke zhoršení kvality signálu v důsledku pasivace ani případné oxidace povrchu nedochází.



Obrázek 31: Vliv předúpravy povrchu pracovní elektrody na voltametrickou odezvu 5-ASA. Metoda CV, elektrolyt BRB (pH 7), $E_{\text{poč}} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{obratu}} = +2200 \text{ mV}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $c_{5\text{-ASA}} = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Dále byl studován vliv pH základního elektrolytu na voltametrickou odezvu 5-ASA, protože hodnota pH a složení základního elektrolytu může významně ovlivňovat tvar a pozici sledované voltametrické odezvy. Použita byla CV, jako základní elektrolyt sloužil BRB v rozsahu pH 2-12 a koncentrace 5-ASA v roztoku byla $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Oxidační pík 5-ASA byl pozorován v rozsahu pH 2-9, ale při vyšších hodnotách pH již nebyl na anodické křivce žádný signál zaznamenán. Jak je vidět na obrázku 32A, proudová odezva 5-ASA postupně klesala od pH 2 do 4 a poté opět postupně rostla až do pH 7. Do hodnoty pH 9 byla voltametrická odezva 5-ASA stabilní. Dále je na obrázku 32B zobrazena závislost E_p na pH, ze které vyplývá, že se zvyšujícím se pH docházelo k posunu oxidačního signálu k méně pozitivním potenciálům, což svědčí o podílu protonů na probíhající elektrodové reakci. Pro veškerá další měření byl jako vhodný základní elektrolyt vybrán BRB pH 7.

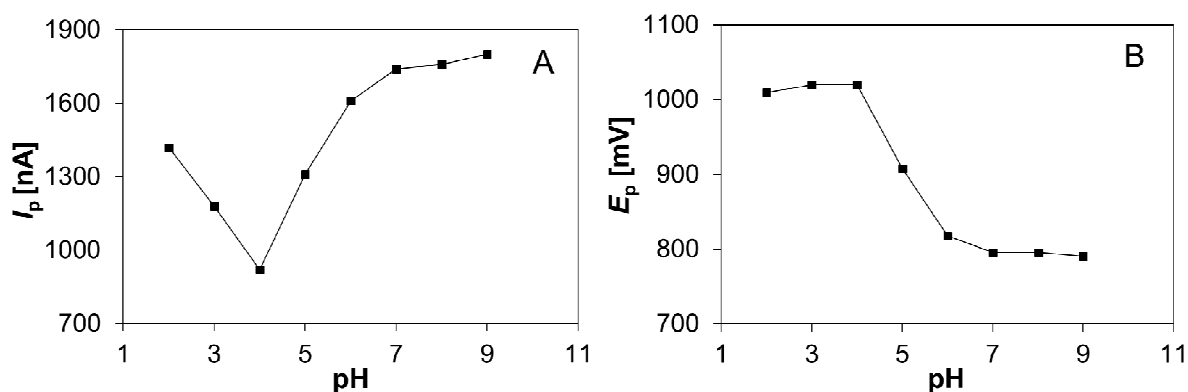
Pro testování vlivu rychlosti polarizace na sledovaný signál 5-ASA byla použita CV v prostředí BRB o pH 7. Koncentrace 5-ASA byla opět $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a rychlost polarizace byla postupně měněna od 10 do 400 mV. Bylo zjištěno, že voltametrická odezva 5-ASA se postupně zvyšovala s rostoucí rychlostí polarizace, ale závislost I_p na ν není lineární. Naopak lineární závislost byla získána mezi I_p a $\nu^{1/2}$ a může být vyjádřena rovnicí (7) s příslušným korelačním koeficientem:

$$I_p [\mu\text{A}] = (0,1367 \pm 0,0036) \cdot v^{1/2} [\text{mV}^{1/2} \text{ s}^{-1/2}] + (0,260 \pm 0,044), r = 0,9919. \quad (7)$$

Z této závislosti tedy lze učinit závěr, že elektrodový proces je kontrolován difuzí, což je pro BDDE běžné vzhledem k nízké adsorpci elektroaktivních látek nebo produktů redoxních reakcí na elektrodový povrch. Na závěr byla vynesena logaritmická závislost I_p na v , která je popsána rovnicí (8) s příslušným korelačním koeficientem:

$$\log(I_p [\mu\text{A}]) = (0,4339 \pm 0,0099) \cdot \log(v [\text{mV s}^{-1}]) - (0,650 \pm 0,020), r = 0,9938. \quad (8)$$

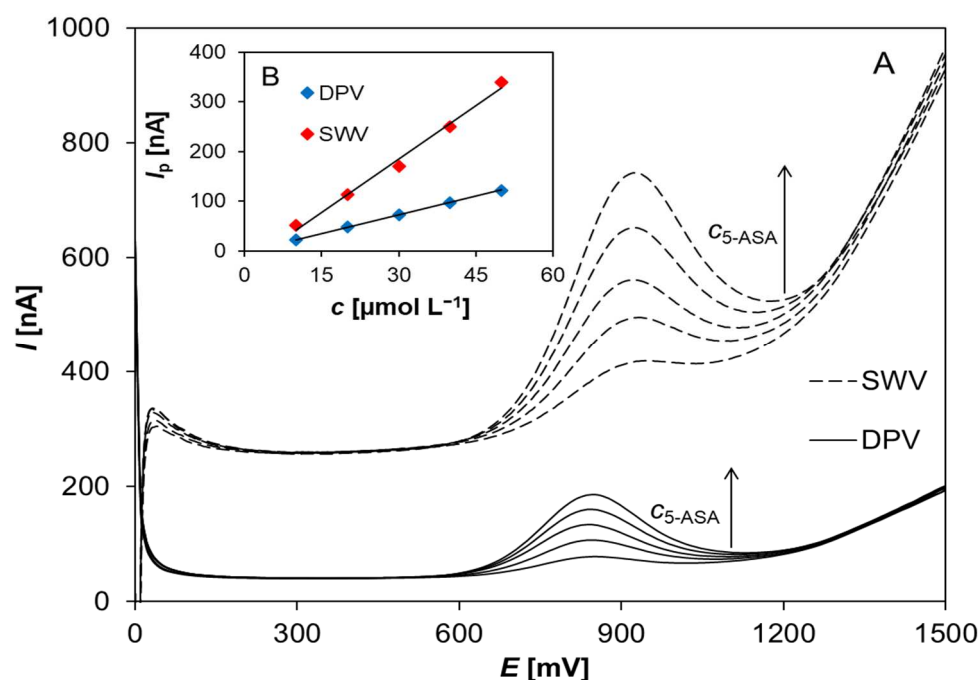
Jak již bylo výše zmíněno, pro logaritmickou závislost I_p na v je významná hodnota směrnice, která v tomto případě činí 0,4339. Hodnota 0,5 sice neleží v intervalu spolehlivosti směrnice (na úrovni významnosti $p = 0,05$), ale difuze může být považována za hlavní řídicí proces s možným vlivem kinetiky.



Obrázek 32: Závislosti výšky píku (A) a potenciálu píku (B) na pH získané na BDDE. Metoda CV, elektrolyt BRB (pH 2-9), $E_{\text{poč}} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{kon}} = +2200 \text{ mV}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $c_{5\text{-ASA}} = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

3.1.2.2 Vývoj voltametrické metody stanovení mesalazinu

V úvodu této kapitoly byla pozornost věnována výběru metody pro stanovení 5-ASA v modelových roztocích, kdy byly testovány DPV a SWV. Jako základní elektrolyt byl použit BRB o pH 7 a byly změřeny koncentrační závislosti 5-ASA v rozsahu koncentrací $1,0 \times 10^{-5}$ - $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Získané DP a SW voltamogramy jsou uvedeny na obrázku 33A a na obrázku 33B jsou vyneseny odpovídající závislosti I_p na c . Je zřejmé, že obě závislosti jsou lineární, ale současně bylo zjištěno, že při měření metodou SWV byla zaznamenána vyšší proudová odezva 5-ASA a rovněž směrnice prezentovaných závislostí svědčí o vyšší citlivosti této metody. Proto byla pro vývoj metody stanovení 5-ASA vybrána SWV.



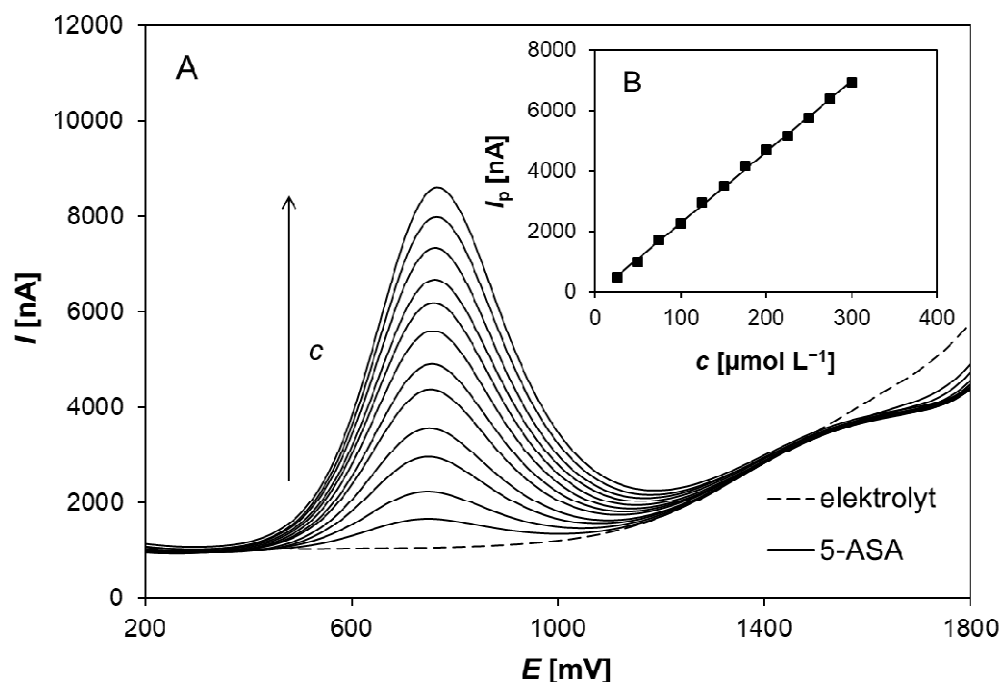
Obrázek 33: DP a SW voltamogramy 5-ASA v závislosti na koncentraci zaznamenané na BDDE (A), závislosti výšky píku na koncentraci (B). Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 7), $E_{\text{poč}} = 0$ mV, $E_{\text{kon}} = +2200$ mV, výška pulzu = 25 mV, šířka pulzu = 50 ms, $\nu = 20$ mV s⁻¹; Metoda SWV, elektrolyt BRB (pH 7), $E_{\text{poč}} = 0$ mV, $E_{\text{kon}} = +2200$ mV, potenciálový krok = 5 mV, $A = 20$ mV, $f = 25$ Hz, $c_{5-ASA} = 1,0 \times 10^{-5}$ - $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Základní parametry SWV, jako je frekvence (f), amplituda (A) a potenciálový krok, byly optimalizovány. Veškeré experimenty byly realizovány v BRB (pH 7) při koncentraci 5-ASA 5×10^{-5} mol L⁻¹. Potenciálový krok byl měněn od 1 do 10 mV (f 25 Hz, A 20 mV). Velikost zaznamenaného oxidačního signálu 5-ASA strmě rostla se zvyšujícím se potenciálovým krokem až do hodnoty 7 mV, poté již signál dále nerostl. Proto byla nastavena hodnota potenciálového kroku 7 mV. Amplituda byla měněna od 10 do 100 mV (potenciálový krok 7 mV, f 25 Hz). Odezva 5-ASA s rostoucí amplitudou rostla až do hodnoty 70 mV. S dalším zvyšováním pak docházelo k deformaci signálu a ke zhoršení jeho vyhodnotitelnosti. Pro další měření byla zvolena amplituda 70 mV. Frekvence byla testována v rozsahu od 5 do 50 Hz (potenciálový krok 7 mV a A 70 mV). Pík 5-ASA rostl do hodnoty 35 Hz a poté se opět postupně snižoval. Pro veškerá další měření byla tedy vybrána frekvence 25 Hz.

Navržená metoda stanovení 5-ASA byla ověřena při analýze modelových roztoků. Nejprve byla ověřena opakovatelnost měření, kdy bylo zaznamenáno 11 opakovaných křivek při koncentraci 5-ASA 5×10^{-5} mol L⁻¹ a byla vypočtena $RSD_M(11)$ 2,70 %, která svědčí o velmi dobré opakovatelnosti měření. Dále byla proměřena řada koncentračních závislostí 5-ASA. Na obrázku 34 je uveden příklad pro koncentraci od $2,5 \times 10^{-5}$ do $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Ze

získaného SW voltamogramu je zřejmé, že I_p rostla se zvyšující se $c_{5\text{-ASA}}$ lineárně (rovnice 9). Z proměřených koncentračních závislostí byl stanoven LDR $2,0 \times 10^{-6} - 3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Z nejnižší změřené koncentrační závislosti ($2 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) byly vypočítány statistické parametry LOD $7,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a LOQ $2,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

$$I_p [\mu\text{A}] = (0,02430 \pm 0,00022) \cdot c [\mu\text{mol L}^{-1}] - (0,122 \pm 0,039), r = 0,9991 \quad (9)$$



Obrázek 34: SW voltamogramy 5-ASA v závislosti na koncentraci zaznamenané na BDDE (A), závislost výšky píku na koncentraci (B). Metoda SWV, elektrolyt BRB (pH 7), $E_{\text{poč}} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{kon}} = +2200 \text{ mV}$, potenciálový krok = 7 mV, $A = 70 \text{ mV}$, $f = 25 \text{ Hz}$, $c_{5\text{-ASA}} = 2,5 \times 10^{-5} - 3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

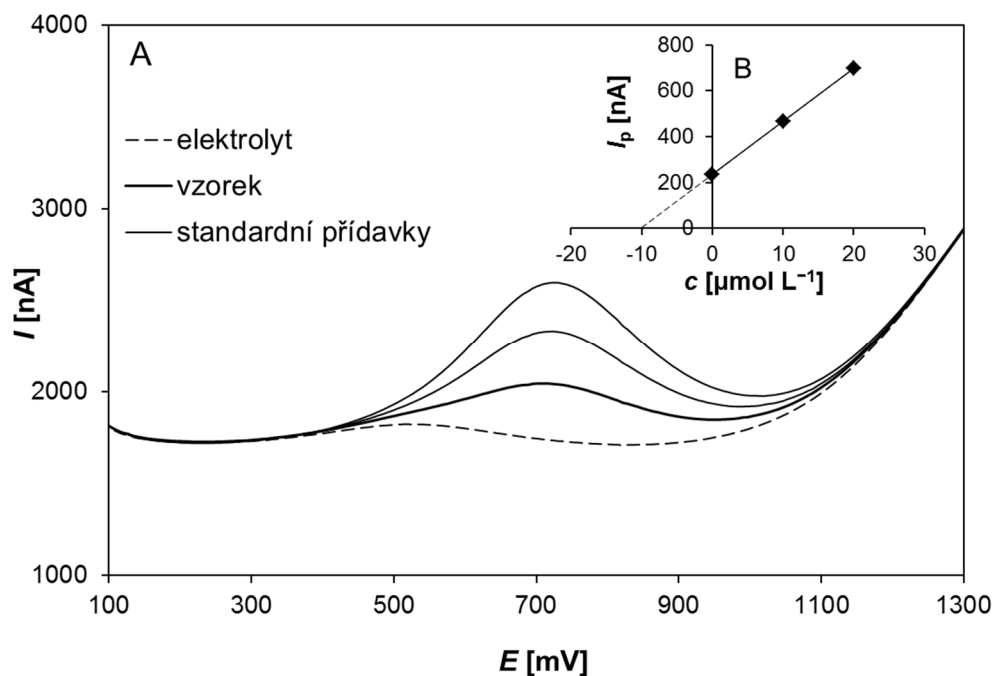
Dále byla použitelnost metody ověřena při stanovení 5-ASA v modelových roztocích. Stanovení bylo vždy 5× opakováno, a to pro dvě různé koncentrace $5,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Vždy byly do polarografické nádoby přidány 2-3 standardní přídavky roztoku 5-ASA. Vypočtena byla vždy průměrná koncentrace 5-ASA s odpovídajícím intervalem spolehlivosti na hladině významnosti 0,05, $RSD_s(5)$ a výtěžnost. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 6. Ze získaných hodnot je zřejmé, že stanovení 5-ASA s využitím metody SWV ve spojení s BDDE je správné a velmi dobře opakovatelné.

Tabulka 6 Výsledky opakovaných stanovení 5-ASA v modelových roztocích

Dáno [mol L ⁻¹]	Stanoveno [mol L ⁻¹]	Výtěžnost [%]	RSD _s (5) [%]
$5,0 \times 10^{-5}$	$(5,030 \pm 0,033) \times 10^{-5}$	99,4-101,8	1,00
$1,0 \times 10^{-5}$	$(1,010 \pm 0,010) \times 10^{-5}$	99,2-103,0	1,50

Analýza praktického vzorku

Jako praktické vzorky sloužily v této části práce farmaceutický přípravek Pentasa® a vzorek lidské moči obohacený o 5-ASA přidavkem standardu. Nejprve byly analyzovány tablety farmaceutického přípravku, a to metodou standartního přidavku. Postup přípravy vzorku k analýze je uveden v experimentální části. Stanovení 5-ASA bylo opakováno 5× a opět byla vypočítána RSD_s(5). Příklad stanovení 5-ASA ve farmaceutickém přípravku je uveden na obrázku 35 a získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 7. Bylo zjištěno, že stanovení je správné a velmi dobře opakovatelné.



Obrázek 35: Stanovení 5-ASA ve farmaceutickém přípravku Pentasa® metodou standartního přidavku na BDDE (A) a grafické vyhodnocení metody standartního přidavku (B). Metoda SWV, elektrolyt BRB (pH 7), $E_{\text{poč}} = 0$ mV, $E_{\text{kon}} = +2200$ mV, potenciál kroku = 7 mV, $A = 70$ ms, $f = 25$ Hz, standartní přidavky: $V = 20$ μl , $c_{5\text{-ASA}} = 0,01$ mol L⁻¹.

Vhledem k plánované analýze vzorku moči byla následně realizována interferenční studie zaměřená na analýzu biologických vzorků. V tomto experimentu byl studován efekt různých látek, jako jsou biomolekuly (např. kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina močová, močovina, glukóza, sacharóza, kreatinin, kyselina barbiturová nebo kyselina šťavelová) nebo ionty (např. K^+ , Na^+ , Cl^- , PO_4^{3-} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , $C_4H_5O_6^-$, SO_4^{2-}), které mohou být přítomny v tomto typu vzorků. Koncentrace 5-ASA v modelových roztocích byla $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a testována byla přítomnost $10 \times$ nižší (poměr koncentrací 1:0,1), stejné (1:1) a $10 \times$ vyšší (1:10) koncentrace potenciálně interferující látky. Látky, které ovlivnily výšku signálu 5-ASA o více než 5 % byly považovány za významný interferent rušící stanovení analytu ve vzorku. Při studiu vlivu iontů bylo zjištěno, že žádný z testovaných aniontů nebo kationtů neměl významný vliv na voltametrickou odezvu 5-ASA, žádná změna signálu 5-ASA nepřekročila 5 %. Naproti tomu výsledky získané při interferenční studii s biomolekulami byly komplikovanější. Některé látky neovlivňovaly stanovení 5-ASA vůbec (např. sacharóza, glukóza, močovina nebo kyselina barbiturová) a některé testované látky způsobovali jen nepatrné snížení signálu 5-ASA (např. kyselina askorbová a kreatin). Látkou, která velmi silně ovlivňovala odezvu 5-ASA, byla kyselina listová, která ovlivňovala jeho stanovení již při nízké koncentraci a při vyšší koncentraci signál 5-ASA úplně překrývala. V organismech a v biologických vzorcích se bohužel kyselina listová vyskytuje běžně.

Tabulka 7 Výsledky opakovaných stanovení 5-ASA ve farmaceutickém přípravku Pentasa® a lidské moči

Vzorek	Deklarováno [mg/tbl]	Stanoveno [mg/tbl]	Výtěžnost [%]	RSDs(5) [%]
Pentasa®	500	(501±13)	95,2-104,4 %	3,79
	Dáno [mol L⁻¹]	Stanoveno [mol L⁻¹]		RSDs(5) [%]
Lidská moč	$1,0 \times 10^{-4}$	$(1,010 \pm 0,040) \times 10^{-4}$	93,4-110,0 %	6,04

Navzdory těmto zjištěním byla navržená metoda aplikována při stanovení 5-ASA v moči. Vzorek lidské moči byl obohacen o 5-ASA na konečnou koncentraci $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Autoři Quereshia a Cohenb [145] uvádějí, že denní dávka 5-ASA se může pohybovat od 3,0 do 4,0 g/den a celková exkrece v moči se pohybuje mezi 11-33 %. Vzhledem k průměrnému množství moči za den, může být koncentrace 5-ASA v moči v řádech $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Postup

přípravy vzorku k analýze je popsán v experimentální části práce. Stanovení probíhalo metodou standardního přídávku a opět bylo 5× zopakováno. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 7. Bylo zjištěno, že 5-ASA v moči lze stanovit, a to bez jakékoli úpravy vzorku či separace analytu, a výsledky jsou správné. Nízká RSDs(5) také vypovídá a velmi dobré opakovatelnosti stanovení. Navíc citlivost metody je, vzhledem k výše uvedeným informacím o možných koncentračních hladinách 5-ASA v reálných vzorcích moči, dostatečná.

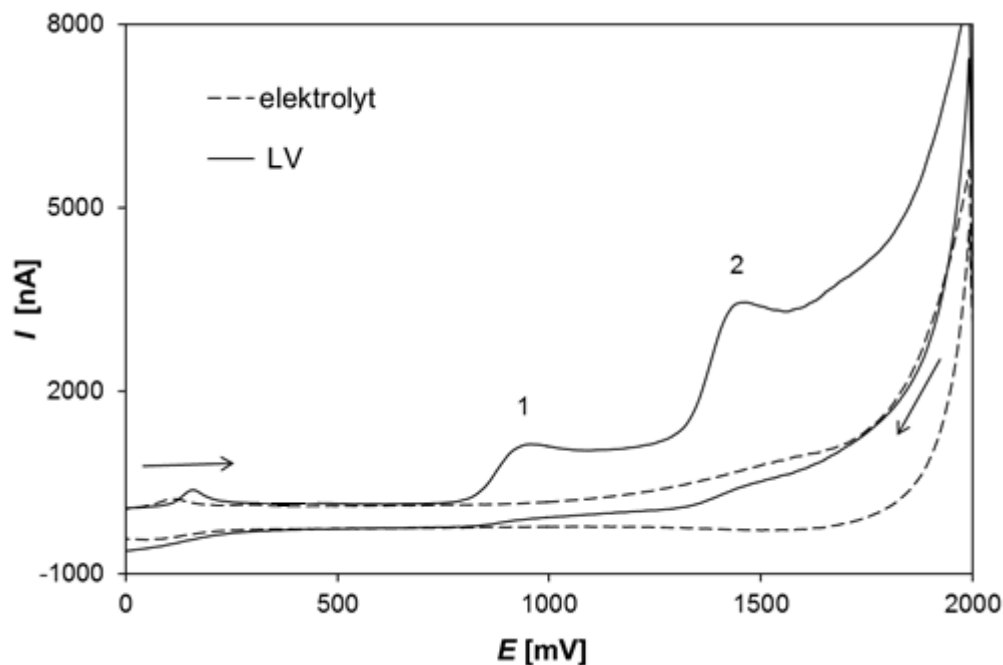
3.1.3 Leukovorin

3.1.3.1 Studium voltametrického chování leukovorinu

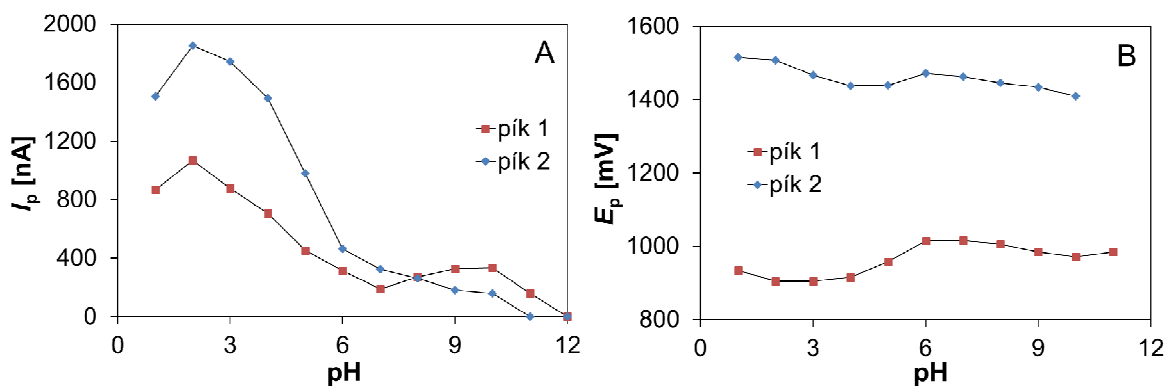
Poslední látkou, jejíž voltametrické chování bylo studováno na BDDE, bylo léčivo leukovorin. Opět byl nejdříve proměřen cyklický voltamogram, a to pro koncentraci LV v polarografické nádobce $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ v prostředí BRB o pH 5. Tato hodnota pH byla převzata z literatury [139]. Rozsah potenciálů byl od $E_{\text{poč}} -1000 \text{ mV}$ do $E_{\text{obratu}} +2000 \text{ mV}$ a v 100 mV s^{-1} . Bylo zjištěno, že za daných podmínek LV poskytuje 2 významné oxidační signály okolo $E_p +950 \text{ mV}$ a $+1450 \text{ mV}$. Jak již bylo výše popsáno tyto signály odpovídají pravděpodobně dvoustupňové oxidaci na pteridinovém jádře. Na katodické křivce byly pozorovány velice malé odpovídající redukční signály, které vypovídají o quazi-reverzibilním průběhu elektrodové reakce. Získaný cyklický voltamogram je uveden na obrázku 36.

V dalším kroku byl studován vliv pH základního elektrolytu s využitím CV. Pro zajištění silně kyselého prostředí (pH 1) byla použita $0,05 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$. Pro zajištění prostředí o pH 2-12 byl použit BRB. Měřeno bylo opět při koncentraci LV $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a vyhodnocovány byly oba oxidační píky. Z obrázku 37A je evidentní, že nejvyšší proudové odezvy LV byly pozorovány v kyselém prostředí (pH 2). S rostoucí hodnotou pH se první signál postupně snižoval a rozšiřoval. Vyhodnotitelnost druhého píku byla v alkalickém prostředí významně ovlivněna rozkladem základního elektrolytu, resp. vylučováním kyslíku. V silně alkalickém prostředí (pH 10-11) nebyly pozorovány žádné signály odpovídající oxidaci LV. Jako vhodný základní elektrolyt byl vybrán BRB o pH 2, ale při opakovaném měření bylo zjištěno, že pík 1 je v tomto prostředí velmi špatně opakovatelný a postupně se snižuje. Současně se tvořil nový signál při pozitivnějších potenciálech, který naopak při opakovaném měření narůstal. Tento efekt je pravděpodobně způsoben nestabilitou analytu v silně kyselém prostředí. Z tohoto důvodu bylo při studiu voltametrického chování LV i nadále měřeno v BRB o pH 5, ve kterém již podobné jevy nebyly pozorovány. Výběru

vhodného základního elektrolytu pro stanovení LV bude pak pozornost věnována i v následující kapitole.



Obrázek 36: Cyklický voltamogram LV zaznamenaný na BDDE. Metoda CV, elektrolyt BRB (pH 5), $E_{\text{poč}} = -1000$ mV, $E_{\text{obratu}} = +2000$ mV, $\nu = 100$ mV s⁻¹, $c_{\text{LV}} = 5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.



Obrázek 37: Závislosti výšky píků (A) a potenciálu píků 1, 2 (B) na pH získané na BDDE. Metoda CV, elektrolyt H₂SO₄ (0,05 mol L⁻¹), BRB (pH 2-12), $E_{\text{poč}} = -1000$ mV, $E_{\text{kon}} = +2000$ mV, $\nu = 100$ mV s⁻¹, $c_{\text{LV}} = 5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Dále byl pro upřesnění charakteru elektrodové reakce studován vliv rychlosti polarizace na 1. i 2. oxidační signál LV. Použita byla CV v prostředí BRB o pH 5 při $c_{LV} 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a v byla měněna od 25 do 500 mV s^{-1} . Obě voltametrické odezvy LV s rostoucí v rostly, ale nikoli lineárně, takže se nejedná o adsorpci řízenou reakci. Za lineární lze naopak považovat závislosti I_p na $v^{1/2}$ pro oba signály LV. Tyto závislosti mohou být popsány rovnicemi 10 (pík 1) a 11 (pík 2) s příslušnými korelačními koeficienty. Ze získaných lineárních závislostí vyplývá, že sledované reakce jsou řízeny difuzí nebo má difuze na jejich průběh významný vliv. Následně byly vyneseny logaritmické závislosti I_p na v , které jsou popsány rovnicemi 12 (pík 1) a 13 (pík 2) s příslušnými korelačními koeficienty. Pro oba oxidační signály LV se pohybují hodnoty směrnic mezi hodnotami 0 a 0,5 (konkrétně 0,2117 a 0,3747), z čehož lze usuzovat na složitější elektrodové děje, které jsou významně ovlivněny nejen difuzí, ale i kinetikou nějaké předřazené nebo následné chemické reakce.

$$I_p [\text{nA}] = (20,60 \pm 0,39) \cdot v^{1/2} [\text{mV}^{1/2} \text{ s}^{-1/2}] + (3425 \pm 6,4), r = 0,9967. \quad (10)$$

$$I_p [\text{nA}] = (59,6 \pm 1,1) \cdot v^{1/2} [\text{mV}^{1/2} \text{ s}^{-1/2}] + (258 \pm 19), r = 0,9967. \quad (11)$$

$$\log(I_p [\text{nA}]) = (0,2117 \pm 0,0042) \cdot \log(v [\text{mV s}^{-1}]) + (2,3230 \pm 0,0010), r = 0,9968. \quad (12)$$

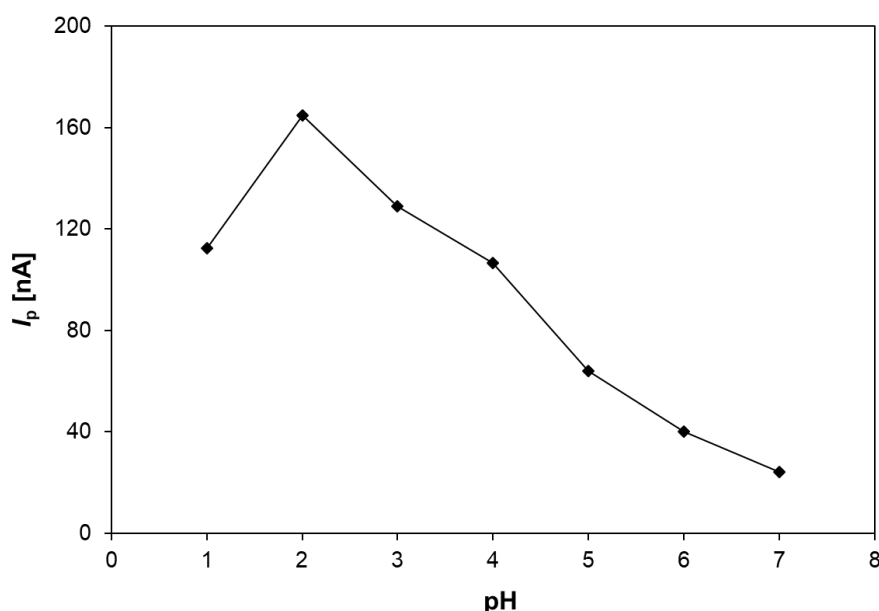
$$\log(I_p [\text{nA}]) = (0,3747 \pm 0,0054) \cdot \log(v [\text{mV s}^{-1}]) + (2,185 \pm 0,013), r = 0,9981. \quad (13)$$

3.1.3.2 Vývoj voltametrické metody stanovení leukovorinu

Pro vývoj voltametrické metody stanovení LV v modelových roztocích byla vybrána pro svou citlivost DPV. Nejprve byla ověřena volba pH základního elektrolytu pro stanovení LV. S ohledem na lepší umístění a tedy i lepší vyhodnotitelnost, byl pro stanovení LV vybrán pík 1. Tento experiment probíhal v rozsahu pH 1-7, protože jak již bylo uvedeno výše, lepší proudová odezva LV byla pozorována v kyselé oblasti. Koncentrace LV byla $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, parametry DPV jsou uvedeny pod obrázkem 38. Ze závislosti I_p na pH (obrázek 38) je evidentní, že nejvyšší proudová odezva LV byla opět pozorována pro BRB o pH 2. S dalším zvyšováním pH základního elektrolytu docházelo k postupnému snižování signálu LV.

Vzhledem k předchozím zjištěním o špatné opakovatelnosti signálu v kyselém prostředí, bylo změřeno 11 křivek LV o koncentraci $1 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ v prostředí BRB o pH 2 a byla vypočtena hodnota $RSD_M(11)$ 8,3 %. Jak je vidět z obrázku 39A, během opakování

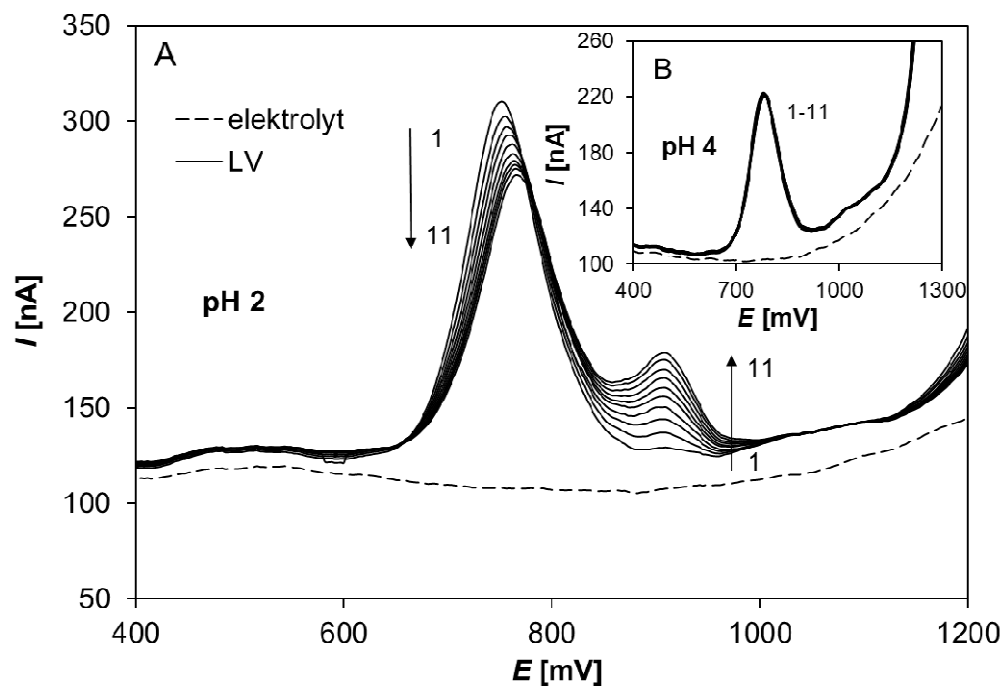
měření dochází k postupnému snižování výšky píku a současně se tvoří druhý signál při pozitivnějších potenciálech, který naopak s opakovaným měřením narůstá. Z tohoto důvodu bylo prostředí o pH 2 vyhodnoceno pro další experimenty jako nevhodné a byla ověřena opakovatelnost měření pro BRB o pH 3, 4 a 5. Na obrázku 39B je uveden příklad opakovaného měření pro pH 4. Vypočtené hodnoty $RSD_M(11)$ jsou shrnuty v tabulce 8. Se zvyšováním pH docházelo k významnému zlepšení opakovatelnosti měření a již při pH 3 bylo dosaženo velmi dobrých výsledků. Současně výška píku vyla v porovnání s ostatními testovanými hodnotami pH nejvyšší. Proto byla tato hodnota pH vybrána pro veškeré další experimenty.



Obrázek 38: Závislost výšky píku na pH získaná na BDDE. Metoda DPV, elektrolyt H_2SO_4 ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$), BRB (pH 2-7), $E_{poč} = -700 \text{ mV}$, $E_{kon} = +1800 \text{ mV}$, $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$, výška pulzu = 50 mV , šířka pulzu = 50 ms , $c_{LV} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Tabulka 8 Opakovatelnost měření $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ LV v prostředí BRB v závislosti na pH

pH	I_p [nA]	$RSD_M(11)$ [%]
2	$161,4 \pm 8,8$	8,3
3	$132,8 \pm 1,7$	1,9
4	$107,09 \pm 0,62$	0,9
5	$64,53 \pm 0,83$	1,9



Obrázek 39: DP voltamogramy opakovaného měření LV při pH 2 (A) a pH 4 (B) zaznamenané na BDDE
 Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 2, 4), $E_{\text{poč}} = -700$ mV, $E_{\text{kon}} = +1800$ mV, $\nu = 25$ mV s⁻¹, výška pulzu = 50 mV, šířka pulzu = 50 ms, $c_{\text{LV}} = 1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

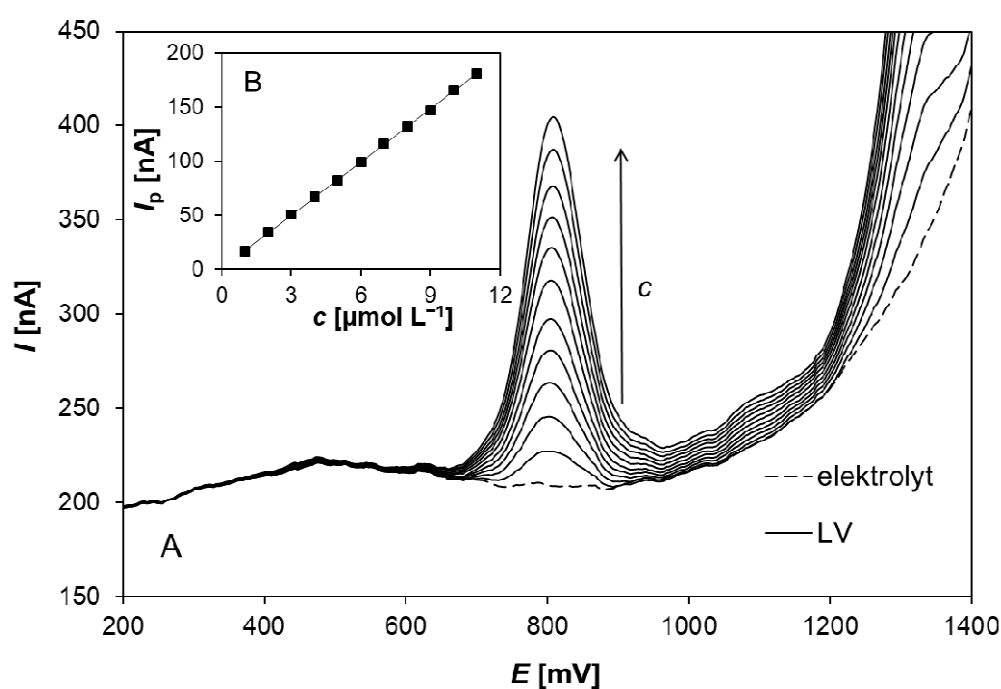
Dále byly optimalizovány parametry DPV pro stanovení LV. Testovány byly opět rychlost polarizace, výška a šířka potenciálového pulzu. Při všech následujících experimentech byl použit BRB o pH 3, koncentrace LV v polarografické nádobce byla 5×10^{-6} mol L⁻¹ a měřeno bylo v rozsahu potenciálů od $E_{\text{poč}} -700$ mV do $E_{\text{kon}} +1800$ mV. Rychlost polarizace byla měněna v rozsahu od 10 do 100 mV s⁻¹ (výška pulzu 50 mV, délka pulzu 50 ms). I_p LV se s rostoucí ν zvyšovala, nárůst signálu byl přibližně lineární do hodnoty 40 mV s⁻¹, poté se zpomalil a docházelo k rozšiřování píku. Proto byla vybrána ν 40 mV s⁻¹. Výška pulzu byla testována v rozsahu od 10 do 100 mV (ν 40 mV s⁻¹, šířka pulzu 50 ms) a bylo zjištěno, že s rostoucí výškou pulzu roste I_p LV lineárně mezi hodnotami 10 až 60 mV. Při vyšších hodnotách se signál LV postupně rozšiřoval. Jako optimální byla vybrána hodnota výšky pulzu 50 mV. Šířka pulzu byla měněna od 10 do 100 ms (ν 40 mV s⁻¹, výška pulzu 50 mV). S rostoucí šířkou pulzu se snižoval oxidační signál LV až do hodnoty 60 ms. Poté se již I_p výrazně neměnila. Pro další měření byla nastavena šířka pulzu 20 ms.

V závěru byla navržená metoda DPV s optimalizovanými parametry aplikována při stanovení LV v modelových roztocích. Byla proměřena řada koncentračních závislostí. Příklad voltamogramů závislosti v rozsahu koncentrací 1×10^{-6} až $1,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ je uveden

na obrázku 40. I_p LV rostla se zvyšující se koncentrací lineárně a tato závislost může být popsána rovnicí 14 s příslušným korelačním koeficientem:

$$I_p [\text{nA}] = (16,389 \pm 0,062) \cdot c [\mu\text{mol L}^{-1}] + (0,61 \pm 0,42), r = 0,9999 \quad (14)$$

Z nejnižší naměřené koncentrační závislosti LV ($1,5 \times 10^{-7}$ – $1,7 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) byly vypočítány statistické parametry LOD $1,5 \times 10^{-8}$ a LOQ $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Takto nízký limit detekce byl dán velmi dobrou linearitou koncentrační závislosti, která byla použita k výpočtu. Dále byl stanoven LDR navržené metody od $1,5 \times 10^{-7}$ do $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.



Obrázek 40: Koncentrační závislost LV zaznamenaná na BDDE (A), závislost výšky píku na koncentraci (B). Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 3), $E_{\text{poč}} = -700$ mV, $E_{\text{kon}} = +1800$ mV, $\nu = 40$ mV s⁻¹, výška pulzu = 50 mV, šířka pulzu = 20 ms, $c_{\text{LV}} = 1 \times 10^{-6}$ – $1,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

V dalším kroku byla ověřena opakovatelnost měření LV v modelových roztocích při navržených podmínkách, a to pro koncentraci 1×10^{-6} mol L⁻¹. Vypočtená $RSD_M(11)$ 0,70 % svědčí o velmi dobré opakovatelnosti měření. Opakovatelnost stanovení LV byla testována s využitím 3 modelových roztoků o různých koncentracích. Měřeno bylo metodou standardního přídávku a každé stanovení bylo opakováno 5×. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 9. Žádná z hodnot $RSD_S(5)$ nepřekročila 3 %, což svědčí o velmi dobré

opakovatelnosti stanovení. Současně z vypočtených průměrných koncentrací s příslušnými intervaly spolehlivosti vyplývá, že stanovení je správné.

Tabulka 9 Výsledky opakovaných stanovení LV v modelových roztocích

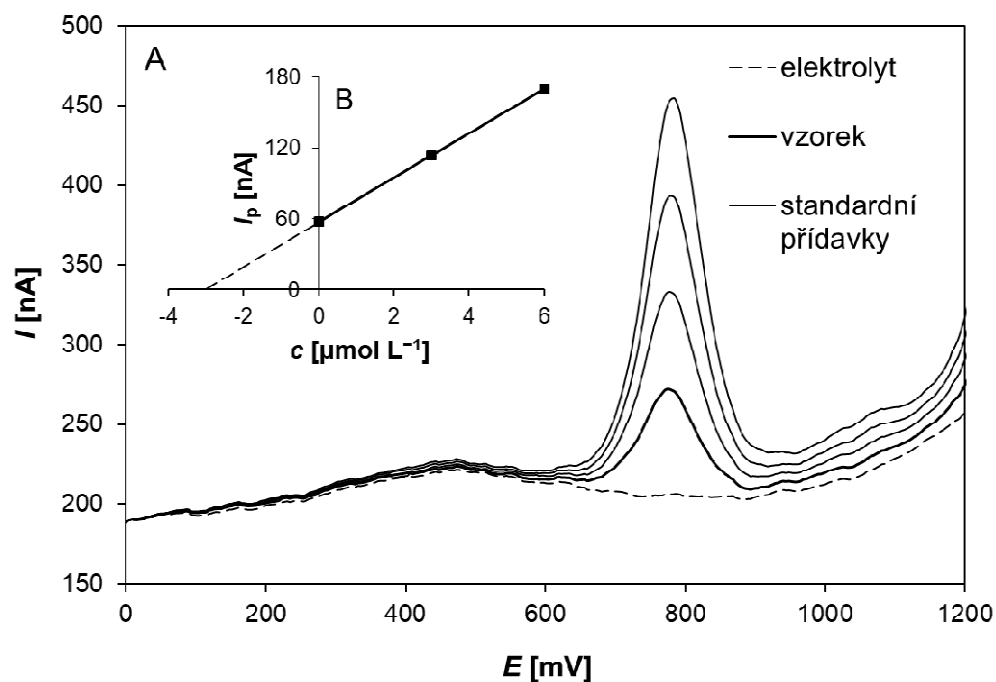
Dáno [mol L ⁻¹]	Stanoveno [mol L ⁻¹]	Výtěžnost [%]	RSDs(5) [%]
1,0×10 ⁻⁵	(1,010±0,017)×10 ⁻⁶	98,0-105,0	2,57
3,0×10 ⁻⁶	(3,030±0,035)×10 ⁻⁶	98,3-102,6	1,74
3,0×10 ⁻⁷	(3,000±0,029)×10 ⁻⁷	99,0-102,6	1,46

Analýza praktického vzorku

Navržená metoda pro stanovení LV byla použita při analýze farmaceutického přípravku. Jednalo se o prášek pro přípravu injekčního roztoku „Leucovorin Ca LACHEMA 10“ s deklarovaným obsahem 10 mg LV na jednu ampuli. Postup přípravy vzorku je uveden v experimentální části v kapitole 2.3. Stanovení probíhalo metodou standardního přídávku a bylo opakováno 5×. V tabulce 10 je shrnuto vypočítané množství LV i další statistické parametry. Bylo zjištěno, že stanovení LV ve vzorku farmaceutického přípravku je velmi dobře opakovatelné a správné. Příklad voltamogramů získaných při stanovení LV s vloženým grafickým vyhodnocením metody standardního přídávku je uveden na obrázku 41.

Tabulka 10 Výsledky opakovaného stanovení LV ve farmaceutickém přípravku

Deklarováno [mg]	Stanoveno [mg]	Výtěžnost [%]	RSDs(5) [%]
10	10,08±0,12	98,7-102,8	1,81



Obrázek 41: Stanovení LV v roztoku farmaceutického přípravku metodou standardního přídavku na BDDE (A) a grafické vyhodnocení metody standardního přídavku (B). Metoda DPV, elektrolyt BRB (pH 3), $E_{\text{poč}} = -700$ mV, $E_{\text{kon}} = +1800$ mV, $\nu = 40$ mV s⁻¹, výška pulzu = 50 mV, šířka pulzu = 20 ms, standardní přídavky: $V = 20$ μl , $c_{\text{LV}} = 0,001$ mol L⁻¹.

3.1.4 Shrnutí základních parametrů navržených metod

V předchozích kapitolách byly shrnuty výsledky studia voltametričkého chování vybraných biologicky aktivních látek, konkrétně herbicidu linuronu a léčiv mesalazinu a leukovorinu, na BDDE a byl popsán vývoj metod pro jejich stanovení na základě měření oxidačních signálů. Vzhledem k tomu, že text je poměrně rozsáhlý, byly získané výsledky v této kapitole z důvodu přehlednosti shrnuty v tabulce 11. Ta zahrnuje vypočtené základní statistické parametry vyvinutých analytických metod jako LDR, LOD a LOQ nebo hodnoty RSD pro opakované měření, či stanovení v modelových roztocích. Součástí tabulky je také použitá voltametričká metoda, základní elektrolyt a analyzovaný praktický vzorek.

Tabulka 11 Shrnutí pH a základních statistických parametrů pro stanovení LIN, 5-ASA a LV

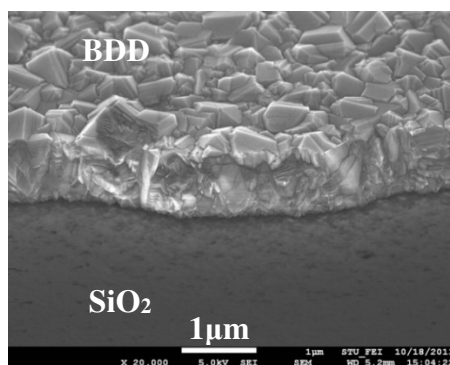
	Linuron	Mesalazin	Leukovorin
Metoda	DPV	SWV	DPV
pH	BRB (pH 2)	BRB (pH 7)	BRB (pH 3)
LOD [mol L⁻¹]	$1,4 \times 10^{-7}$	$7,0 \times 10^{-7}$	$1,5 \times 10^{-8}$
LOQ [mol L⁻¹]	$4,7 \times 10^{-7}$	$2,3 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-8}$
LDR [mol L⁻¹]	$5,0 \times 10^{-7} - 1,2 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-6} - 3,0 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-7} - 2,5 \times 10^{-5}$
RSD_{s(5)} [%]	≤1,49	≤1,50	≤2,57
RSD_{M(11)} [%]	0,84	2,70	0,70
Praktický vzorek	říční voda	farmaceutický přípravek moč	farmaceutický přípravek

3.2 Charakterizace borem dopovaných diamantových elektrod s různým obsahem boru

Jedním z parametrů, které významně ovlivňují fyzikálně-chemické i elektrochemické vlastnosti BDDE, je obsah boru. Tato kapitola je proto zaměřena na charakterizaci elektrod s různým obsahem boru. Experimenty byly prováděny s laboratorně připravovanými BDDE, kdy depozice filmu probíhala v prostředí 1% plynné směsi CH_4 s H_2 a s poměrem B/C v plynné fázi 1000, 2000, 4000, 8000, 10 000 a 20 000 ppm (Slovenská technická univerzita v Bratislavě, Slovenská republika). Nejprve byly tyto elektrody charakterizovány z hlediska jejich povrchu pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a Ramanovy spektroskopie. Pro následnou elektrochemickou charakterizaci byla využívána elektrochemická impedanční spektroskopie a zejména pak CV reverzibilních redoxních systémů $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$. Jak již bylo popsáno v teoretické části této disertační práce, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ se řadí v případě BDDE mezi redoxní systémy označované jako *inner-sphere* (tento typ reakce je velmi citlivý na kvalitu povrchu elektrody). Naopak $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ se řadí mezi *outer-sphere* redoxní systémy (elektroda slouží pouze jako zdroj elektronů a kinetika probíhajících reakcí není příliš citlivá na fyzikálně chemické vlastnosti povrchu elektrody).

3.2.1 Skenovací elektronová mikroskopie

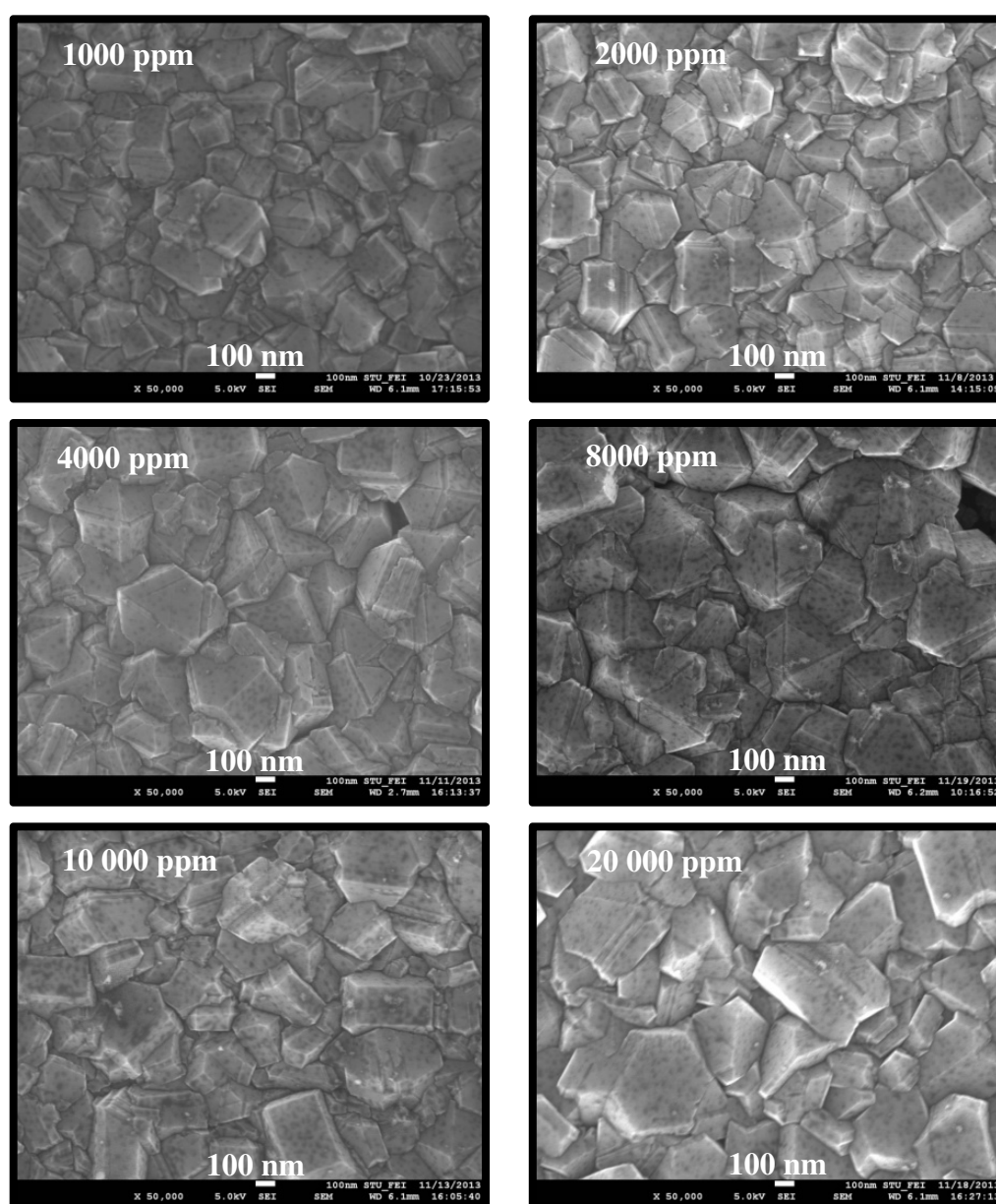
Nejprve byly všechny připravené BDD filmy s různým obsahem boru zkoumány s využitím SEM. Na obrázku 42 je zobrazeno rozhraní mezi deponovaným BDD filmem a povrchem vrstvy oxidu křemičitého na Si substrátu. Je zřejmé, že film tvoří na povrchu substrátu souvislou a kompaktní vrstvu.



Obrázek 42: Snímek rozhraní mezi vytvořeným BDD filmem a SiO_2 substrátem ze SEM (úhel pohledu 45°).

Snímky povrchu jednotlivých testovaných elektrod s různým obsahem boru (1000-20 000 ppm) jsou prezentovány na obrázku 43. Na snímcích je možné vidět, že všechny

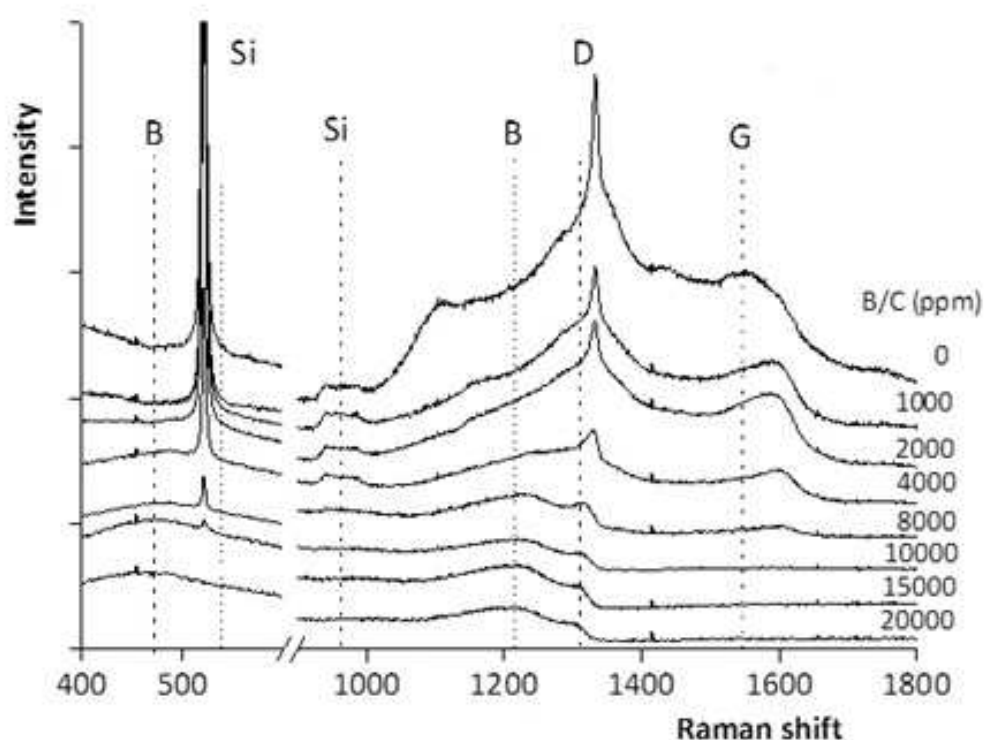
testované filmy představují kontinuální povlaky bez trhlin a dutin, které zcela pokrývají substrát. Tato kompaktní struktura neumožňuje pronikání základního elektrolytu, jeho složek ani dalších látek během aplikace v elektroanalytických měření. Současně bylo zjištěno, že se zvyšujícím se poměrem B/C docházelo ke zvětšování zrn ve struktuře diamantového filmu. Tento trend však nebyl příliš zřetelný. V literatuře se obvykle uvádí, že s rostoucím obsahem boru velikost zrn klesá [82, 85-87]. Vyskytují se ale i práce zaznamenávající opačný trend, kdy se velikost krystalů s rostoucím poměrem B/C zvětšuje [84] stejně jako v případě elektrod, jež jsou předmětem této disertační práce. V práci [99] pozorovali autoři totožné krystaly, jejichž velikost nezávisela na obsahu boru. Tyto rozdílné výsledky přisuzují autoři odlišným podmínkám při depozici filmu.



Obrázek 43: Snímky povrchu testovaných BDDE ze SEM.

3.2.2 Ramanova spektroskopie

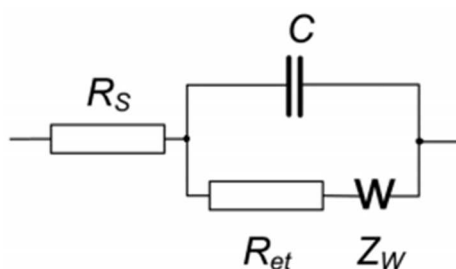
Další metodou použitou pro charakterizaci BDD elektrod byla Ramanova spektroskopie. Spektra byla měřena při vlnové délce 632 nm pro BDD filmy s poměry B/C 0-20 000 ppm. Na obrázku 44 jsou uvedena získaná Ramanova spektra zobrazující pásy charakteristické pro borem dopovaný diamant. U diamantového filmu s poměrem B/C 0 ppm byl pozorován jeden ostrý pík při 1335 cm^{-1} odpovídající sp^3 uhlíkovým vazbám. To znamená, že na křemíkovém substrátu byl deponován vysoce kvalitní diamant. Se zvyšujícím se obsahem boru dochází k postupnému snižování tohoto signálu. Další dva významné pásy byly pozorovány přibližně při 470 a 1220 cm^{-1} . Tato dvě maxima souvisí se zabudováním boru do mřížky diamantu a dochází k jejich nárůstu se zvyšujícím se obsahem boru. Další pík byl zaznamenán při 1580 cm^{-1} . Tento signál odpovídá sp^2 grafitickému uhlíku, který souvisí s přítomností nečistot v diamantovém filmu. Dále byly pozorovány 2 pásy okolo 520 a 960 cm^{-1} , které odpovídají přítomnosti Si.



Obrázek 44: Ramanova spektra BDD filmů s poměrem B/C v plynné fázi při depozici 0-20 000 ppm zaznamenaná při vlnové délce 632 nm.

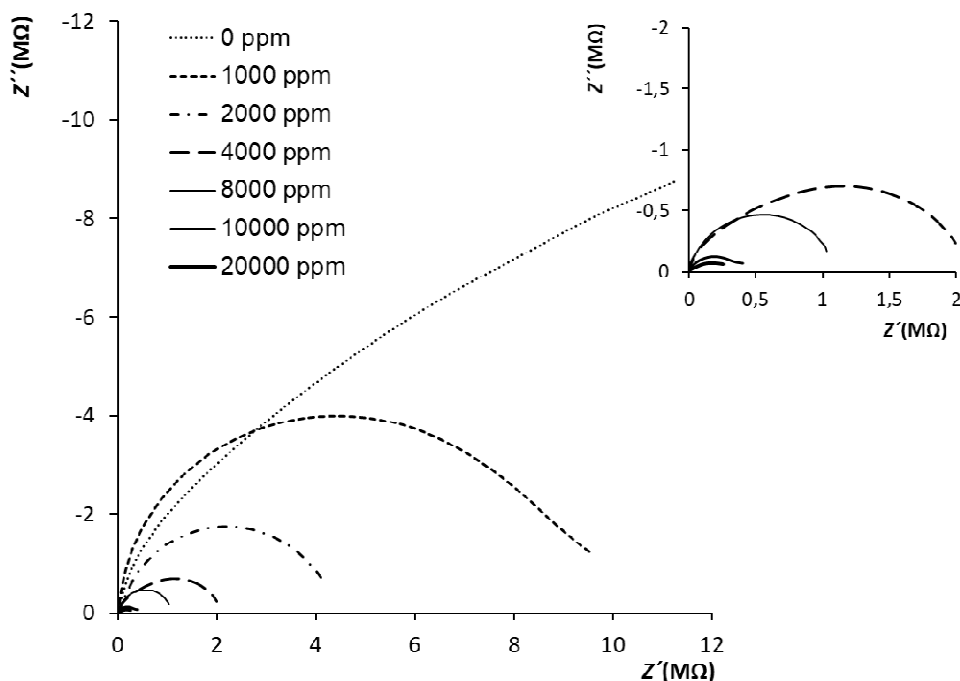
3.2.3 Elektrochemická impedanční spektroskopie

EIS je velmi užitečným nástrojem s dobře propracovanou teorií, kterou lze popsat elektrické vlastnosti zkoumaného elektrochemického systému (obvodu) pomocí aplikace střídavého napětí jako funkce aplikované frekvence. Pro realizované experimenty byl zvolen ekvivalentní elektrický obvod (Obrázek 45) sestávající ze sériového odporu (R_s) spojeného smyčkou s paralelní kombinací členu konstantního fázového posunu a sériově spojeného odporu R_{et} a Warburgovy impedance, která popisuje difuzí řízené jevy [146].



Obrázek 45: Schéma použitého elektrického obvodu.

V této části práce byly elektrochemicky s využitím EIS v širokém frekvenčním pásmu (od 10 kHz do 0.1Hz) charakterizovány BDD filmy pomocí systému $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ v $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$. Při těchto experimentech byla použita metoda zahrnující měření reálných a imaginárních částí impedance. Nyquistovy grafy elektrochemických impedančních spekter byly získány při zvolených potenciálech, které byly odečteny z cyklických voltamogramů. Nyquistův diagram získaný pro BDDE s různým obsahem boru je uveden na obrázku 46. Získané závislosti mohou být fitovány (aproximovány) polokružnicemi při vysokých frekvencích. Pro každou testovanou elektrodu byla zaznamenána jedna polokružnice. Tento výsledek souvisí s procesem přenosu náboje na pevném/kapalném rozhraní. Může to také souviset se začleněním substitučního boru do diamantové mřížky [147, 148]. Data získaná z EIS odpovídají modelu popisujícímu přenos náboje na povrchu BDDE [146]. Vztah mezi impedancí a rychlostí přenosu elektronů byl objasněn a koreluje s rozsahem B/C od 0 do 20 000 ppm. Z obrázku 46 je patrné, že impedance klesá se zvyšujícím se obsahem boru, což znamená, že přenos elektronu je mnohem snazší, resp., rychlejší se zvyšujícím se poměrem B/C. Pokles impedance analyzovaného elektrochemického systému odpovídá poklesu odporu BDDE se zvyšujícím se obsahem boru. Lze tedy říci, že úroveň dopování borem výrazně ovlivňuje elektrochemické vlastnosti připravených BDD filmů.



Obrázek 46: Elektrochemické impedanční spektrogramy $2,5 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ v $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ zaznamenané na BDDE s obsahem B/C 0-20 000 ppm (vložený obrázek – detail grafu); frekvence 0,1-100 kHz, amplituda signálu 10 mV.

3.2.4 Cyklická voltametrie s využitím $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$

Následující text je věnován elektrochemické charakterizaci BDDE s využitím CV *inner-sphere* redoxního systému $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Nejprve byly změřeny cyklické voltamogramy $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ na všech testovaných elektrodách v prostředí $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$. Ze změřených křivek základního elektrolytu byla určena šířka potenciálového okna, resp., využitelný potenciálový rozsah u jednotlivých elektrod. Hranice potenciálového okna byly vyhodnoceny na základě odečtu potenciálu (na anodické i katodické straně), při kterém proud dosáhl $\pm 1500 \text{ nA}$. Odečtené hodnoty potenciálů i celkové potenciálové rozsahy pro jednotlivé elektrody jsou uvedeny v tabulce 12. Bylo zjištěno, že se zvyšujícím se poměrem B/C dochází k zúžení potenciálového okna. Výraznější pak toto zúžení bylo na katodické straně. Nejširší potenciálové okno bylo zaznamenáno u elektrody s poměrem B/C 1000 ppm a činilo 3660 mV. Celkem se potenciálový rozsah zmenšil o přibližně 900 mV mezi elektrodami s poměrem B/C 1000 a 20 000 ppm.

Po přidavku $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ byly zaznamenány cyklické voltamogramy uvedené na obrázku 47 ($E_{\text{poč}} = -1600 \text{ mV}$, $E_{\text{obratu}} = +1800 \text{ mV}$ a $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$). Konkrétní parametry

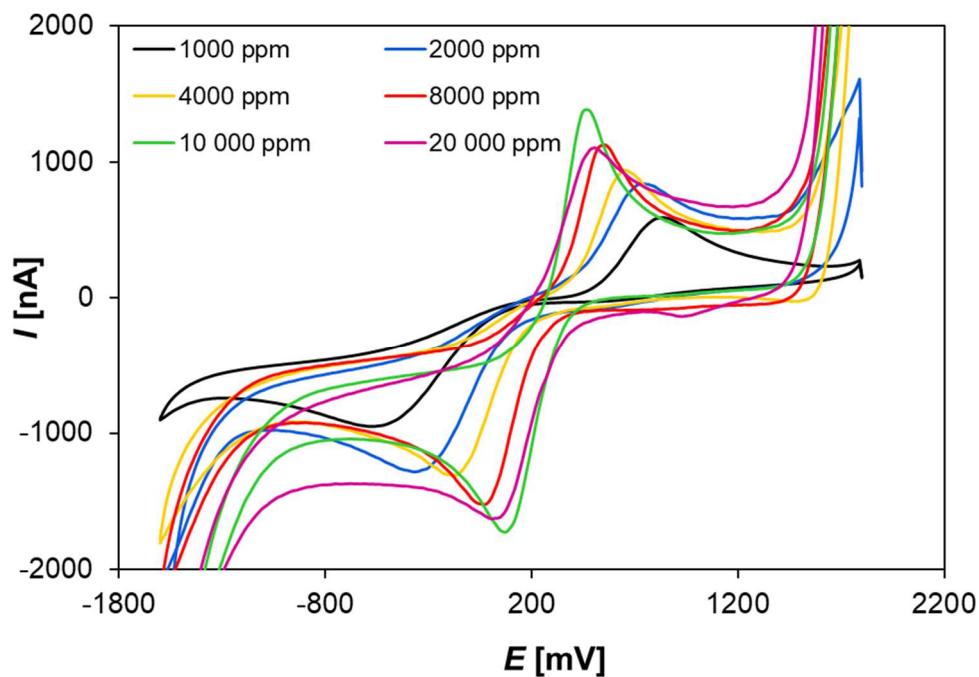
těchto voltametrických křivek, jako jsou výšky anodických a katodických proudových signálů a jejich poměr (I_{pa}/I_{pc}) nebo potenciály anodických a katodických píků a jejich rozdíl (ΔE_p), jsou shrnuty v tabulce 13. Z obrázku i tabulky je patrné, že se zvyšujícím se obsahem boru až do hodnoty B/C 10 000 ppm se zvyšovala reverzibilita probíhající elektrodové reakce, což dokumentuje klesající hodnota ΔE_p (obrázek 48). Tento trend svědčí o zlepšování elektrochemických vlastností testovaných elektrod s rostoucím B/C. Pro elektrodu s poměrem B/C 20 000 ppm došlo k nárůstu ΔE_p , tedy ke zhoršení reversibility reakce. Pro všechny testované elektrody byl potenciálový rozdíl velmi vysoký (1406-491 mV) a ani zdaleka se neblížil teoretické hodnotě 59 mV. To je pravděpodobně dáno *inner-sphere* charakterem použitého redoxního systému, kdy je probíhající elektrodová reakce významně ovlivněna fyzikálně-chemickými vlastnostmi elektrodového povrchu.

Tabulka 12 Potenciály odpovídající anodické (E_a) a katodické (E_c) hranici potenciálového okna a vypočtené celkové potenciálové rozsahy pro jednotlivé elektrody (E_{celk})

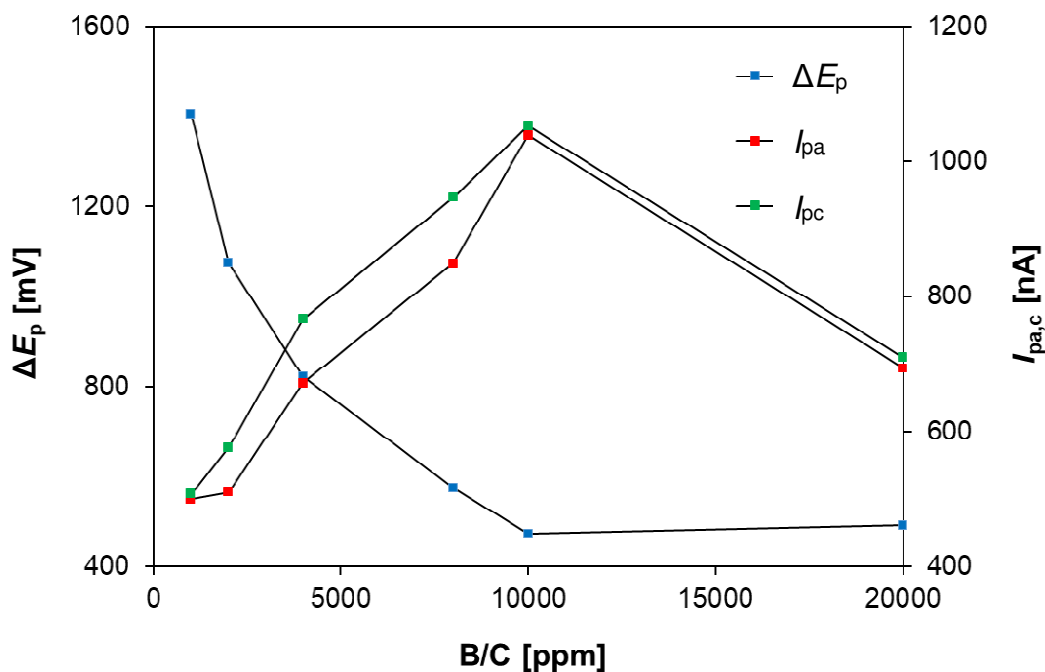
B/C [ppm]	E_a [mV]	E_c [mV]	E_{celk} [mV]
1000	+1960	-1700	3660
2000	+1760	-1510	3270
4000	+1660	-1430	3090
8000	+1590	-1390	2980
10000	+1610	-1200	2810
20000	+1550	-1180	2730

Tabulka 13 Vyhodnocení výšky a polohy píků $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ v závislosti na poměru B/C a hodnoty vypočtených elektroaktivních ploch (A) jednotlivých BDDE

B/C [ppm]	I_{pa} [nA]	I_{pc} [nA]	I_{pa}/I_{pc}	E_{pa} [mV]	E_{pc} [mV]	ΔE_p [mV]	A [mm ²]
1000	500	-507	0,98	829	-577	1406	0,25
2000	510	-576	0,88	720	-355	1075	0,26
4000	672	-767	0,88	659	-163	822	0,30
8000	849	-947	0,89	550	-24	574	0,36
10 000	1039	-1053	0,98	545	72	473	0,60
20 000	694	-710	0,98	503	12	491	0,30



Obrázek 47: Cyklické voltamogramy $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ zaznamenané na testovaných BDDE. Metoda CV, elektrolyt KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), $E_{\text{poč}} = -1600 \text{ mV}$, $E_{\text{obratu}} = +1800 \text{ mV}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

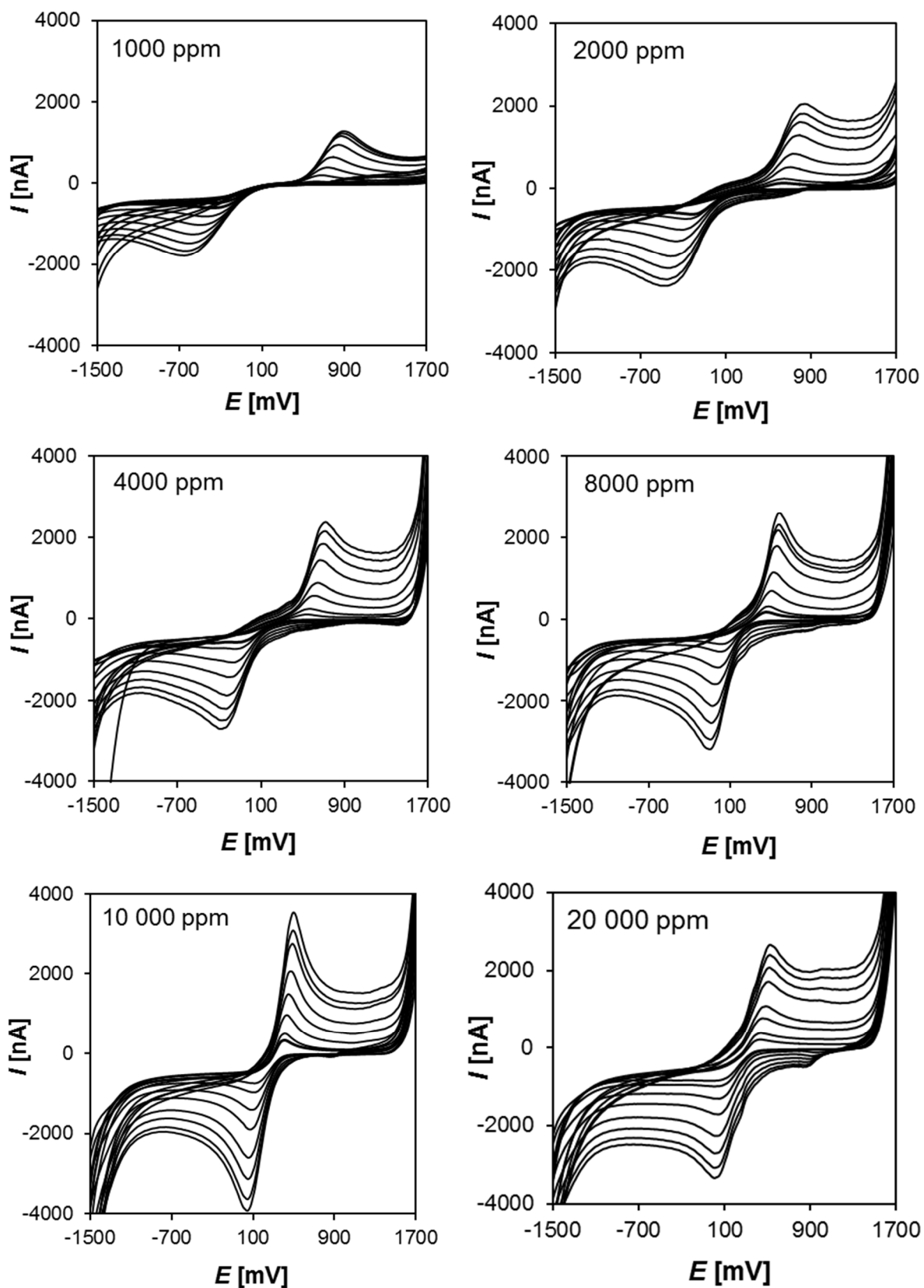


Obrázek 48: Závislosti ΔE_p a I_{pac} na B/C pro $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ zaznamenané na testovaných BDDE. Metoda CV, elektrolyt KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), $E_{\text{poč}} = -1600 \text{ mV}$, $E_{\text{obratu}} = +1800 \text{ mV}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

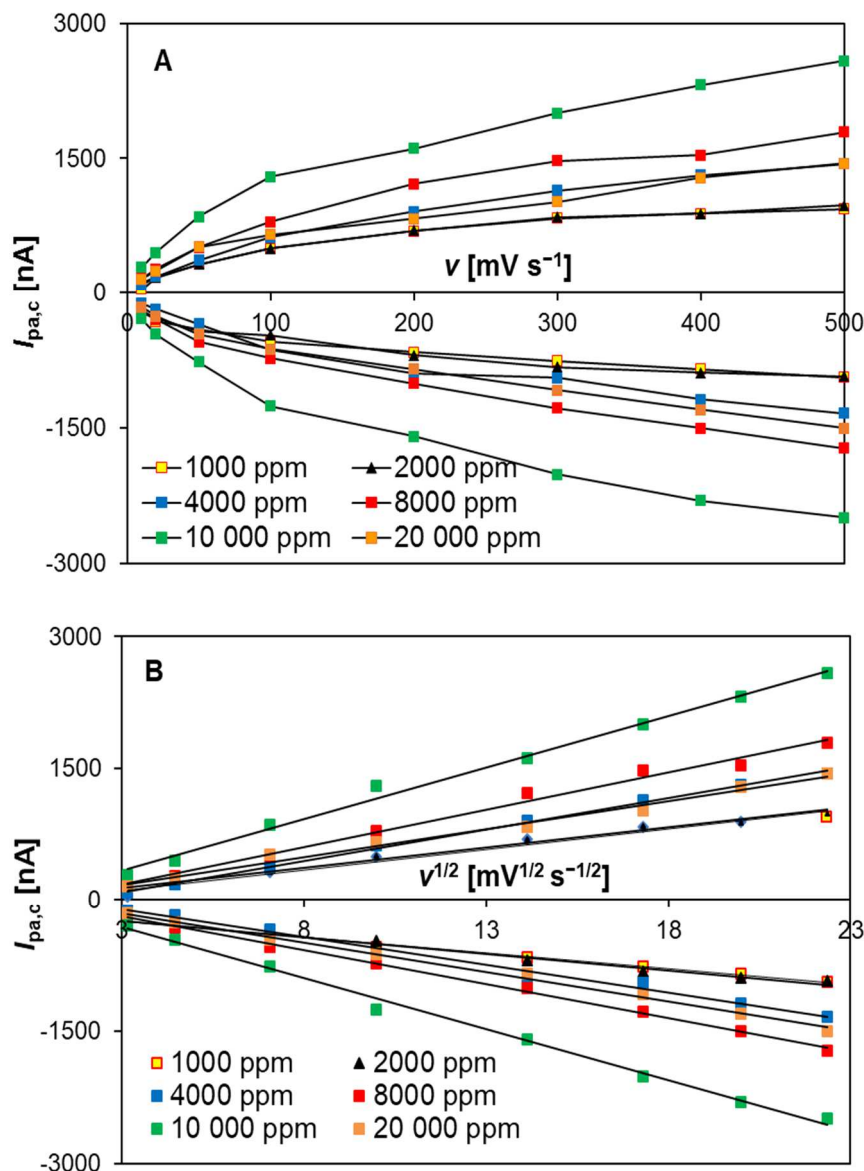
Současně se změnou polohy jednotlivých signálů docházelo se zvyšujícím se poměrem B/C rovněž ke zvyšování proudových signálů, a to až do hodnoty 10 000 ppm (tabulka 13). Tyto výsledky potvrzují vynesené závislosti I_p na B/C na obrázku 48. U elektrody s poměrem B/C 20 000 ppm se výšky anodického a katodického signálu snížily, což může být způsobeno pravděpodobně horší kvalitou BDD filmu, např. přítomností nečistot nebo zhoršením fyzikálně-chemických vlastností povrchu.

Výpočet velikosti elektroaktivního povrchu jednotlivých BDDE vycházel z Randles-Ševčíkovy rovnice ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$) a získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 13. Konkrétní postup výpočtu je popsán v Experimentální části této disertační práce. Ze získaných hodnot vyplývá, že nejmenší elektroaktivní plochu má elektroda s nejmenším obsahem boru (B/C 1000 ppm). Naopak největší plocha byla vypočtena pro elektrodu s B/C 10 000 ppm. Tyto výsledky jsou v souladu s výše uvedenými zjištěními.

V dalším kroku byly proměřeny cyklické voltamogramy $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ v závislosti na rychlosti polarizace ($10\text{-}500 \text{ mV s}^{-1}$) pro všechny testované BDDE. Získané křivky jsou uvedeny na obrázku 49. Bylo potvrzeno, že se zvyšujícím se obsahem boru v BDD filmech docházelo ke snižování ΔE_p a ke zvýšení proudových signálů a že elektroda s poměrem B/C 10 000 ppm vykazovala nejlepší elektrochemické vlastnosti. U elektrody s poměrem B/C 20 000 ppm se sledované parametry voltametrických křivek opět zhoršily. Z naměřených cyklických voltamogramů byly vyhodnoceny výšky katodických i anodických pík $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a byly vyneseny závislosti I_p na v (obrázek 50A), resp., I_p na $v^{1/2}$ (obrázek 50B). Jak je zřejmé z obrázku 50A, závislosti I_p na v nevykazovaly lineární průběh, což vylučuje adsorpci jako řídicí děj elektrodové reakce. Naproti tomu závislosti I_p na $v^{1/2}$ (obrázek 50B) jsou lineární. Hodnota směrnice se postupně zvyšuje se zvyšujícím se obsahem boru a maxima dosáhla pro elektrodu s poměrem B/C 10 000 ppm. Z lineárního průběhu těchto závislostí lze usuzovat na difuzně řízené elektrodové reakce. Tento závěr byl potvrzen také vnesením příslušných logaritmických závislostí $\log(I_p)$ _log(v) pro anodický i katodický signál. Parametry těchto závislostí jsou uvedeny v tabulce 14. Všechny prezentované závislosti vykazují hodnoty směrnic blízké 0,5, což odpovídá difuzně řízeným elektrodovým reakcím. Tento závěr odpovídá typu použité pracovní elektrody, protože je všeobecně známé, že adsorpce látek na povrch BDDE je minimální.



Obrázek 49: Cyklické voltamogramy $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ zaznamenané na testovaných BDDE. Metoda CV, elektrolyt KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), $E_{\text{poč}} = -1600 \text{ mV}$, $E_{\text{obratu}} = +1800 \text{ mV}$, $\nu = 10\text{-}500 \text{ mV s}^{-1}$.



Obrázek 50: Závislosti $I_{pa,c}$ na v (A) a $I_{pa,c}$ na $v^{1/2}$ (B) pro $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ pro testované BDDE. Metoda CV, elektrolyt KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), $E_{poč} = -1600 \text{ mV}$, $E_{obratu} = +1800 \text{ mV}$, $v = 10\text{-}500 \text{ mV s}^{-1}$.

Na závěr této kapitoly byla pro všechny testované BDDE vypočítána zdánlivá rychlostní konstanta přenosu náboje (k_{app}^0) podle Nicholsona (rovnice 1), která se počítá ze závislosti ΔE_p na v . Pro výpočet k_{app}^0 byla použita rychlost polarizace 100 mV s^{-1} a odpovídající hodnota ΔE_p odečtená z výše uvedených měření (obrázek 49). Postup výpočtu je popsán v Experimentální části práce. V tabulce 15 jsou shrnuty vypočítané hodnoty k_{app}^0 , které jsou doplněny parametry použitými k výpočtu. Z tabulky je patrné, že se zvyšujícím se poměrem B/C dochází ke zvyšování hodnoty k_{app}^0 . Pro redoxní systém $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ se zdánlivá rychlostní konstanta přenosu náboje pohybuje zpravidla mezi 10^{-4} a $10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ [92].

V případě elektrod testovaných v rámci této disertační práce se v tomto rozsahu pohybují pouze elektrody s poměrem B/C 8000 až 20 000 ppm. Pro elektrody s nižším obsahem boru vycházela konstanta k_{app}^0 nižší, což svědčí o horších elektrochemických vlastnostech těchto elektrod. Nejvyšší hodnota k_{app}^0 byla vypočtena pro BDDE s poměrem B/C 10 000 ppm a lze tedy uzavřít, že tato elektroda vykazuje nejlepší elektrochemické vlastnosti a umožňuje nejrychlejší přenos elektronu.

Tabulka 14 Statistické parametry logaritmických závislostí $\log(I_p)$ _log (v) pro jednotlivé BDDE

I_p	B/C [ppm]	Směrnice [nA s mV ⁻¹]	Úsek [nA]	r
anodický	1000	(0,589±0,038)	(1,450±0,079)	0,9878
	2000	(0,558±0,026)	(1,531±0,054)	0,9938
	4000	(0,696±0,034)	(1,335±0,072)	0,9928
	8000	(0,611±0,023)	(1,639±0,048)	0,9957
	10 000	(0,551±0,024)	(1,950±0,049)	0,9945
	20 000	(0,543±0,029)	(1,697±0,062)	0,9911
katodický	1000	(0,447±0,001)	(1,809±0,021)	0,9986
	2000	(0,461±0,021)	(1,774±0,045)	0,9936
	4000	(0,622±0,028)	(1,476±0,059)	0,9940
	8000	(0,544±0,014)	(1,767±0,029)	0,9980
	10 000	(0,545±0,017)	(1,953±0,036)	0,9970
	20 000	(0,544±0,014)	(1,701±0,030)	0,9979

Tabulka 15 Vypočtené zdánlivé rychlostní konstanty přenosu náboje (k_{app}^0), včetně parametrů potřebných pro výpočet, pro všechny testované BDDE

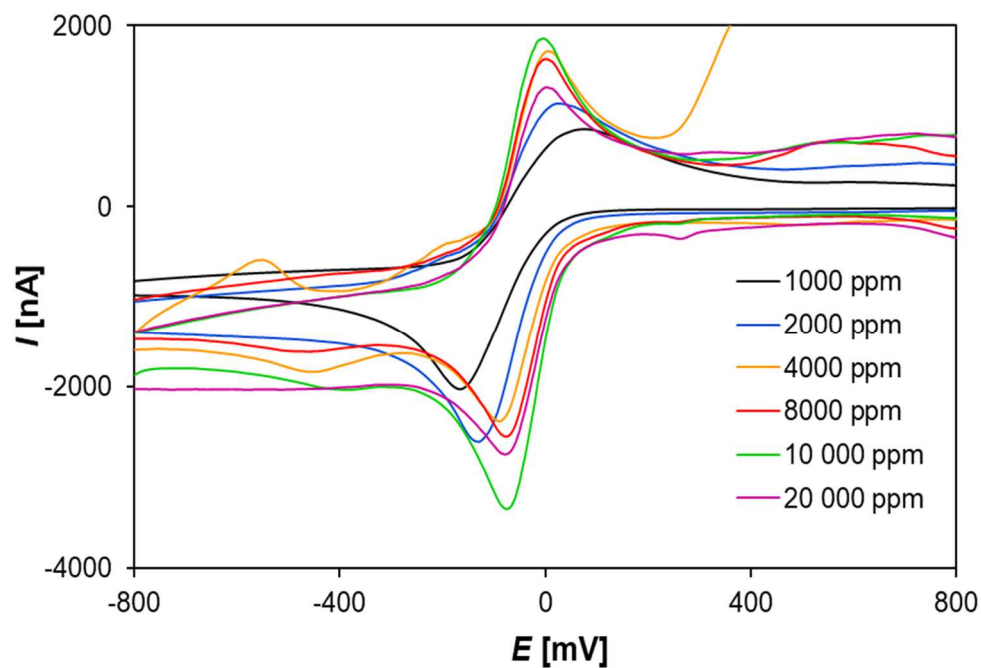
B/C [ppm]	ΔE_p [mV]	Ψ	k_{app}^0 [cm s ⁻¹]
1000	1234	$1,9 \times 10^{-7}$	$1,8 \times 10^{-9}$
2000	1090	$1,2 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-8}$
4000	772	$7,3 \times 10^{-5}$	$7,0 \times 10^{-7}$
8000	574	$9,4 \times 10^{-4}$	$9,0 \times 10^{-6}$
10000	379	$1,2 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-4}$
20000	442	$5,1 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-5}$

3.2.5 Cyklická voltametrie s využitím $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$

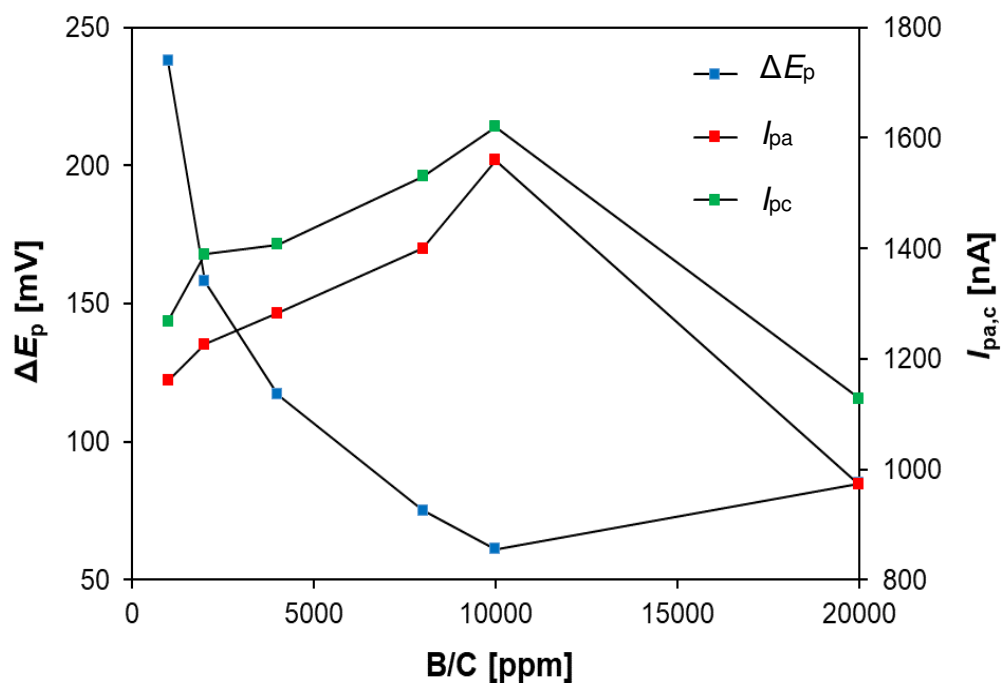
Stejný postup jako v případě $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ byl použit také pro charakterizaci testovaných BDDE pomocí *outer-sphere* redoxního systému $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$. Nejprve byly změřeny cyklické voltamogramy $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ v prostředí $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl ($E_{\text{poč}} -1600 \text{ mV}$, $E_{\text{obratu}} +1800 \text{ mV}$ a $v 100 \text{ mV s}^{-1}$), které jsou uvedeny na obrázku 51. Je patrné, že se zvyšujícím se obsahem boru v BDD filmu se zvyšovala reverzibilita elektrodové reakce. Konkrétní parametry voltametrických křivek, jako jsou I_{pa} a I_{pc} a jejich poměr nebo E_{pa} a E_{pc} a jejich rozdíl, jsou shrnuty v tabulce 16. Obrázek 52 demonstruje průběh závislostí I_{pa} , I_{pc} a ΔE_{p} na poměru B/C. Bylo zjištěno, že s rostoucím poměrem B/C od 1000 do 10 000 ppm se zvyšují proudové odezvy $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ a u elektrody s 20 000 ppm dochází opět k jejímu snížení. Tyto výsledky jsou v souladu s výše popsány závěry pro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Poměr $I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}}$ nejbližší 1 (0,97) byl pozorován u elektrody s poměrem B/C 10 000 ppm. Současně docházelo s rostoucím obsahem boru ke snižování ΔE_{p} , což opět souvisí s rostoucí reverzibilitou reakce. U elektrod s poměrem B/C 8000 a 10 000 ppm se hodnota ΔE_{p} blížila teoretické hodnotě 59 mV, která je typická pro jednoelektronovou reverzibilní elektrodovou reakci. Navíc veškeré hodnoty ΔE_{p} pro $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ byly významně nižší než pro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, což je pravděpodobně dáno *outer-sphere* charakterem redoxního systému $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$.

Tabulka 16 Vyhodnocení výšky a polohy píků $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ v závislosti na poměru B/C

B/C	I_{pa}	I_{pc}	$I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}}$	E_{pa}	E_{pc}	ΔE_{p}
[ppm]	[nA]	[nA]		[mV]	[mV]	[mV]
1000	1161	-1268	0,92	71	-167	238
2000	1226	-1389	0,88	26	-132	158
4000	1283	-1407	0,91	26	-91	117
8000	1400	-1530	0,92	4	-71	75
10 000	1560	-1612	0,97	-10	-71	61
20 000	972	-1128	0,86	8	-77	85



Obrázek 51: Cyklické voltamogramy $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$ zaznamenané na testovaných BDDE. Metoda CV, elektrolyt KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), $E_{poč} = -1600 \text{ mV}$, $E_{obratu} = +1800 \text{ mV}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

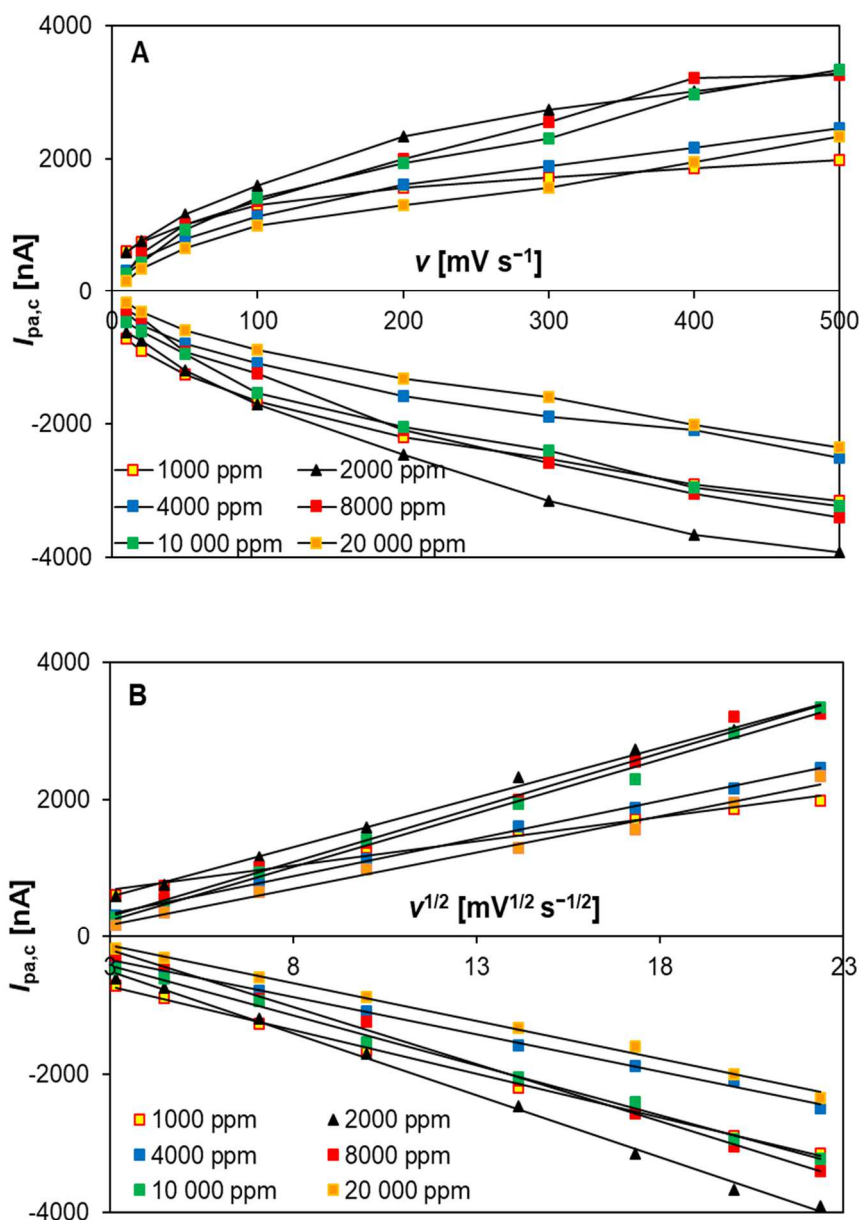


Obrázek 52: Závislosti ΔE_p a $I_{pa,c}$ na B/C pro $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$ zaznamenané na testovaných BDDE. Metoda CV, elektrolyt KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), $E_{poč} = -1600 \text{ mV}$, $E_{obratu} = +1800 \text{ mV}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Následně byl testován vliv rychlosti polarizace na tvar voltametrických křivek $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ s využitím CV. Podmínky byly stejné jako v předchozím experimentu a v byla měněna od 20 do 500 mV s^{-1} . Bylo potvrzeno, že se zvyšujícím se obsahem boru se zmenšuje ΔE_p a zároveň se zvyšuje I_{pa} i I_{pc} , a to do hodnoty 10 000 ppm. Vyšší obsah boru přinesl zhoršení uvedených parametrů stejně jako v případě $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Závislosti I_p na v jsou uvedeny na obrázku 53A a I_p na $v^{1/2}$ na obrázku 53B. Bylo zjištěno, že I_p nerostou lineárně se zvyšující se v , naproti tomu lineární byla závislost I_p na $v^{1/2}$. Toto zjištění svědčí opět o difuzně řízené elektrodové reakci. Statistické parametry logaritmických závislostí $\log(I_p)$ _ $\log(v)$ jsou shrnuty v tabulce 17. Hodnoty směrnic opět potvrzují difuzně řízené elektrodové reakce charakteristické pro BDDE.

Tabulka 17 Statistické parametry závislosti $\log(I_{pa,c})$ na $\log(v)$ na testovaných BDDE pro $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$

I_p	B/C [ppm]	Směrnice [nA s mV ⁻¹]	Úsek [nA]	r
anodický	1000	(0,426±0,013)	(2,296±0,028)	0,9971
	2000	(0,4521±0,0088)	(2,306±0,018)	0,9988
	4000	(0,516±0,014)	(2,005±0,029)	0,9979
	8000	(0,612±0,032)	(1,900±0,068)	0,9918
	10 000	(0,628±0,024)	(1,843±0,051)	0,9956
	20 000	(0,630±0,036)	(1,674±0,076)	0,9902
katodický	1000	(0,452±0,011)	(2,288±0,023)	0,9983
	2000	(0,496±0,015)	(2,257±0,032)	0,9971
	4000	(0,4930±0,0091)	(2,057±0,019)	0,9990
	8000	(0,640±0,018)	(1,824±0,038)	0,9976
	10 000	(0,499±0,014)	(2,160±0,028)	0,9978
	20 000	(0,636±0,016)	(1,658±0,035)	0,9980



Obrázek 53: Závislosti $I_{pa,c}$ na v (A) a $I_{pa,c}$ na $v^{1/2}$ (B) pro $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ pro testované BDDE. Metoda CV, elektrolyt KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), $E_{poč} = -1600 \text{ mV}$, $E_{obratu} = +1800 \text{ mV}$, $v = 10\text{-}500 \text{ mV s}^{-1}$.

Na závěr těchto studií byla vyhodnocena závislost ΔE_p na v a vypočítána k_{app}^0 pro $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$. Největší potenciálový rozdíl byl pozorován u elektrody s poměrem B/C 1000 ppm a postupně se snižoval s rostoucím poměrem B/C až do 10 000 ppm. Pouze u elektrod s vysokým obsahem boru (10 000 a 20 000 ppm) byl zaznamenán výrazný posun potenciálů píků v závislosti na v . U ostatních elektrod se poloha signálů významně neměnila. Vypočítané hodnoty k_{app}^0 pro $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ jsou shrnuty v tabulce 18, a to včetně příslušných ΔE_p a hodnot ψ , které byly odečteny ze závislosti na obrázku 9. Bylo zjištěno, že se konstanta

k_{app}^0 zvyšovala se zvyšující se koncentrací boru až do poměru B/C 10 000 ppm, což svědčí o zlepšování elektrochemických vlastností elektrod s vyšším obsahem boru. Pro tento redoxní systém jsou hodnoty k_{app}^0 o několik řádů vyšší než pro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, což je v souladu s velkými rozdíly ΔE_p pro oba využívané redoxní systémy. Na závěr je tedy možné říci, že i výsledky pro $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2}$ potvrzují zlepšení elektrochemických vlastností BDDE s rostoucím obsahem boru a to včetně rostoucí hodnoty k_{app}^0 svědčící o rychlejším heterogenním přenosu náboje. Jako elektroda s nejlepšími elektrochemickými vlastnostmi se na základě všech prezentovaných studií jeví BDDE s poměrem B/C 10 000 ppm. Vyšší obsah boru již další zlepšení nepřinesl, naopak BDDE s B/C 20 000 ppm byla ve většině sledovaných parametrů horší.

Tabulka 18 Vypočtené zdánlivé rychlostní konstanty přenosu náboje (k_{app}^0), včetně parametrů potřebných pro výpočet, pro testované BDDE

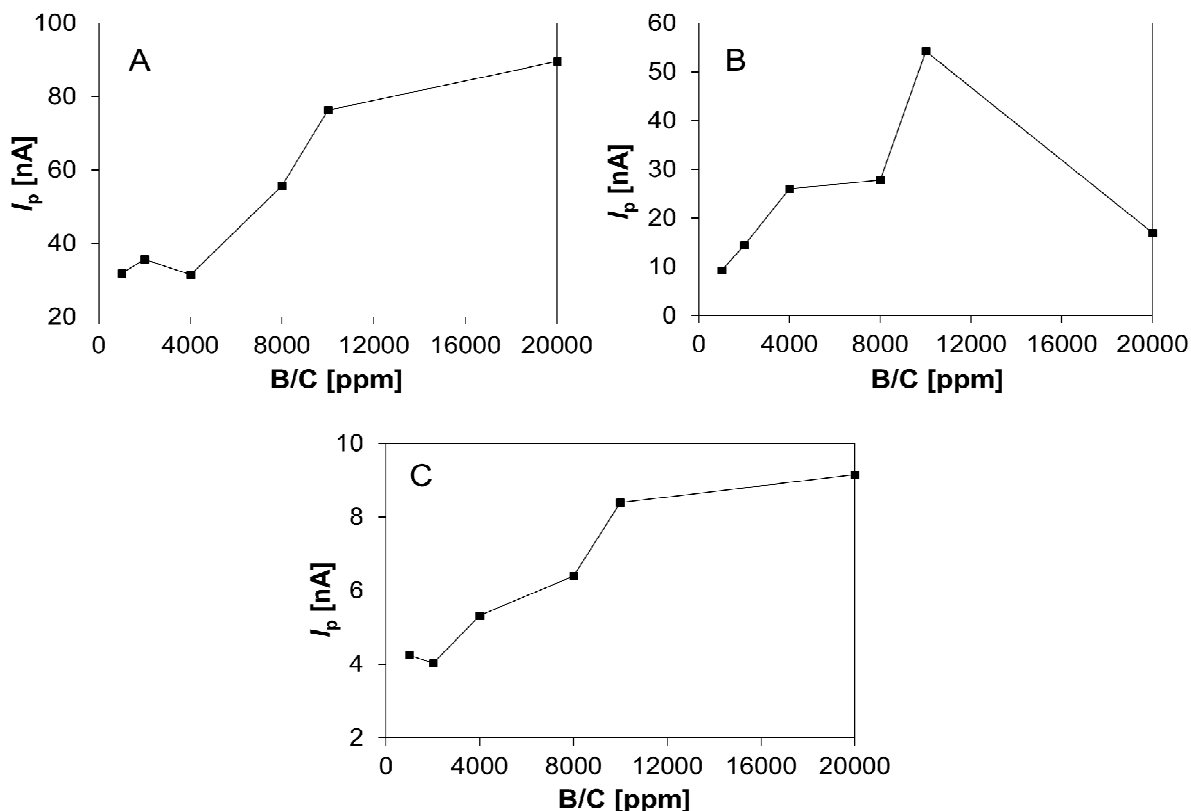
B/C [ppm]	ΔE_p [mV]	Ψ	k_{app}^0 [cm s ⁻¹]
1000	248	0,063	$5,2 \times 10^{-4}$
2000	126	0,32	$2,7 \times 10^{-3}$
4000	96	0,66	$5,5 \times 10^{-3}$
8000	76	1,5	$1,3 \times 10^{-2}$
10 000	62	12	$9,7 \times 10^{-2}$
20 000	86	0,93	$7,7 \times 10^{-3}$

3.3 Aplikační možnosti BDDE s různým obsahem boru při analýze vybraných látek

V poslední části práce byly testovány aplikační možnosti BDDE s různým poměrem B/C (1000-20 000 ppm) prostřednictvím analýzy herbicidu linuronu a léčiv mesalazinu a leukovorinu. Pro stanovení těchto biologicky aktivních látek byly použity výše popsané metody, které byly v rámci této disertační práce vyvinuty pomocí komerčně dostupné BDDE. Cílem bylo získat základní statistické parametry stanovení konkrétních analytů pomocí jednotlivých elektrod a porovnat je v souvislosti s obsahem boru v materiálu elektrody. Všechna následující měření probíhala pro LIN v prostředí BRB o pH 2 metodou DPV ($E_{\text{poč}} +400$ mV, $E_{\text{kon}} +2000$ mV, ν 50 mV s⁻¹, výška pulzu 70 mV, šířka pulzu 20 ms). Pro stanovení 5-ASA byla použita optimalizovaná SWV ($E_{\text{poč}} = 0$ mV, $E_{\text{kon}} = +1800$ mV, $A = 70$ mV, $f = 25$ Hz) v prostředí BRB o pH 7. Poslední studovanou látkou byl LV, kdy byla používána DPV ($E_{\text{poč}} -700$ mV, $E_{\text{kon}} +1800$ mV, ν 40 mV s⁻¹, výška pulzu 50 mV, šířka pulzu 20 ms) a jako základní elektrolyt BRB o pH 3.

3.3.1 Výška proudového signálu v závislosti na obsahu boru

V úvodu této studie byly vyneseny závislosti výšky píků odpovídajících oxidaci jednotlivých analytů LIN (5×10^{-6} mol L⁻¹), 5-ASA (5×10^{-5} mol L⁻¹) a LV (5×10^{-6} mol L⁻¹) na poměru B/C. Získané závislosti jsou uvedeny na obrázku 54. Je zřejmé, že do hodnoty 10 000 ppm ve všech třech případech I_p s rostoucím poměrem B/C narůstá. U LIN dosahuje maxima pro BDDE s poměrem B/C 10 000 ppm a poté výška anodického signálu opět klesá. U 5-ASA a LV ještě sice dochází k nárůstu I_p i mezi elektrodami 10 000 a 20 000 ppm, ale nárůst proudové odezvy již neodpovídá zvýšení obsahu B v BDD filmu. Tento fakt odpovídá předchozím výsledkům, tedy že zvýšení obsahu boru nad 10 000 ppm již nevede k významnému zlepšení elektrochemických vlastností BDDE.



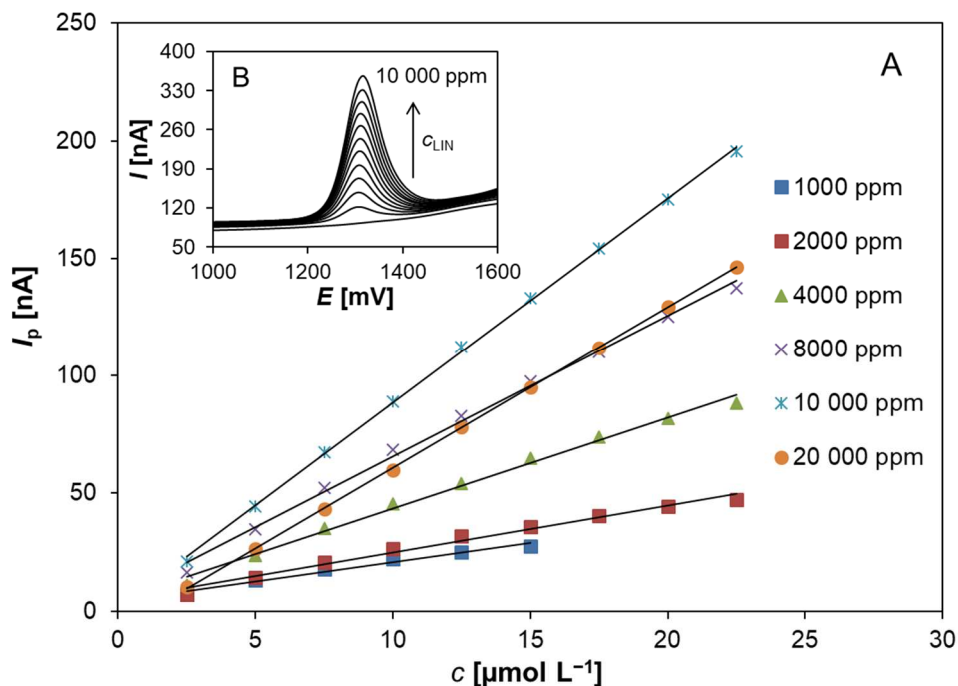
Obrázek 54: Závislosti I_p 5×10^{-5} mol L⁻¹ 5-ASA (A), 5×10^{-6} mol L⁻¹ LIN (B), 5×10^{-6} mol L⁻¹ LV (C) na poměru B/C při depozici BDD filmu. Metoda: DPV, BRB (pH 2), $E_{poč} = +400$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 50$ mV s⁻¹, výška pulzu = 70 mV, šířka pulzu = 20 ms (LIN); SWV, BRB (pH 7), $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +1800$ mV, $A = 70$ mV, $f = 25$ Hz (5-ASA); DPV, BRB (pH 3), $E_{poč} = -700$ mV, $E_{kon} = +1800$ mV, $v = 40$ mV s⁻¹, výška pulzu = 50 mV, šířka pulzu = 20 ms (LV).

3.3.2 Analytické parametry stanovené z koncentračních závislostí

3.3.2.1 Statistické parametry pro linuron

V následujícím kroku byla s využitím všech testovaných BDDE proměřena řada koncentračních závislostí pro studované látky v modelových roztocích. Na obrázku 55A jsou vyneseny závislosti I_p na c pro LIN v rozsahu koncentrací $2,50 \times 10^{-6}$ – $2,25 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ pro elektrody s obsahem boru 1000–20 000 ppm. Z uvedených závislostí vyplývá, že se zvyšujícím se obsahem boru roste směrnice této závislosti (tabulka 19) a tedy citlivost stanovení LIN. Hodnota směrnice dosáhla svého maxima pro BDDE 10 000 ppm a pro BDDE 20 000 ppm opět klesá. Na obrázku 55B jsou pro ilustraci uvedeny DP voltamogramy zmíněné koncentrační závislosti naměřené na BDDE s poměrem B/C 10 000 ppm. Získané statistické parametry metody jako je LDR, LOD, LOQ a $RSD_M(11)$ jsou uvedeny v tabulce

20. Velmi dobré výsledky byly podle předpokladu dosaženy pro elektrody s vyšším obsahem boru (8000 a 10 000 ppm) a překvapivě i pro elektrodu s poměrem B/C 1000 ppm. Konkrétně byl dosažen nejnižší LOD $6,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ pro elektrodu 8000 ppm. Naopak u BDDE 20 000 ppm došlo ke zhoršení sledovaných parametrů.



Obrázek 55: Koncentrační závislosti LIN v rozsahu $2,50 \times 10^{-6}$ – $2,25 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ získané na BDDE s poměrem B/C 1000-20 000 ppm (A), příklad odpovídajících DP voltamogramů LIN naměřených na BDDE s poměrem B/C 10 000 ppm (B). Metoda: DPV, BRB (pH 2), $E_{\text{poč}} = +400$ mV, $E_{\text{kon}} = +2000$ mV, $\nu = 50$ mV s⁻¹, výška pulzu = 70 mV, šířka pulzu = 20 ms.

Tabulka 19 Statistické parametry závislostí I_p [nA] na c [μM] pro LIN z Obr. 55A, $c = 2,5 \times 10^{-6}$ – $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹

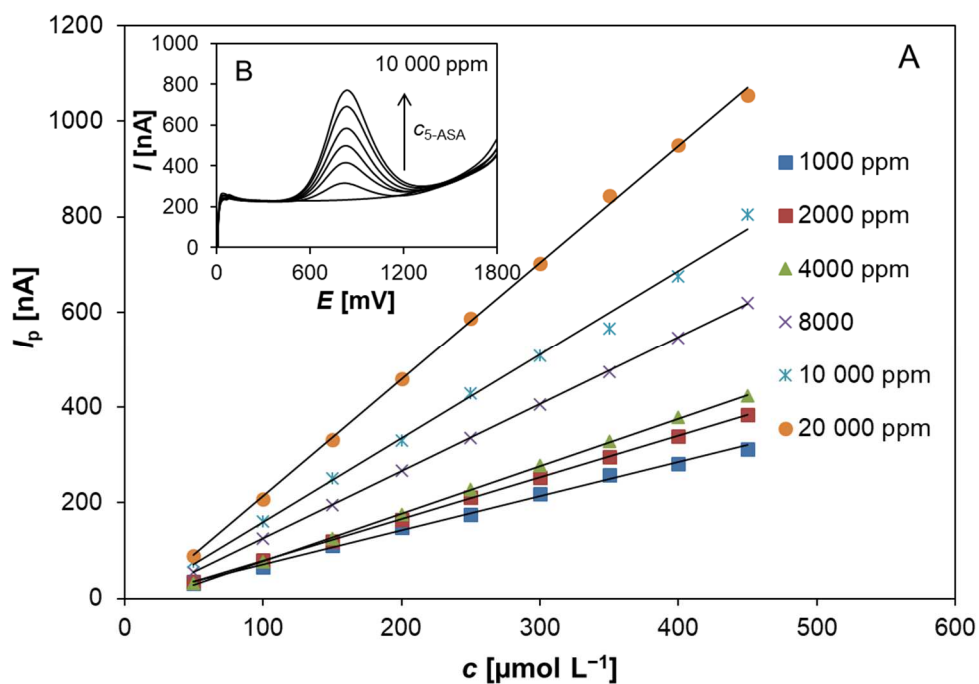
B/C [ppm]	Směrnice [nA $\mu\text{mol L}^{-1}$]	Úsek [nA]	r
1000	(1,63±0,13)	(4,6±1,2)	0,9878
2000	(2,000±0,099)	(4,9±1,4)	0,9915
4000	(3,86±0,12)	(5,0±1,7)	0,9965
8000	(5,99±0,14)	(5,7±2,0)	0,9999
10 000	(8,721±0,045)	(1,23±0,92)	0,9997
20 000	(6,839±0,030)	(-7,57±0,42)	0,9999

Tabulka 20 Statistické parametry stanovení LIN s využitím testovaných BDDE, DPV (BRB pH 2) – $E_{\text{poč}} = +400$ mV, $E_{\text{kon}} = +2000$ mV, $v = 50$ mV s⁻¹, *výška pulzu* = 70 mV, *šířka pulzu* = 20 ms

B/C	LDR	LOD	LOQ	RSD_{M(11)}
[ppm]	[mol L⁻¹]	[mol L⁻¹]	[mol L⁻¹]	[%]
1000	2,5×10 ⁻⁷ -2,5×10 ⁻⁵	1,1×10 ⁻⁷	3,5×10 ⁻⁷	1,2
2000	1,0×10 ⁻⁶ -2,5×10 ⁻⁵	4,0×10 ⁻⁷	1,3×10 ⁻⁶	2,9
4000	1,0×10 ⁻⁶ -3,0×10 ⁻⁵	3,1×10 ⁻⁷	1,0×10 ⁻⁶	1,6
8000	5,0×10 ⁻⁷ -7,0×10 ⁻⁵	6,2×10 ⁻⁸	2,1×10 ⁻⁷	0,4
10 000	5,0×10 ⁻⁷ -9,0×10 ⁻⁵	1,8×10 ⁻⁷	6,1×10 ⁻⁷	0,3
20 000	1,5×10 ⁻⁶ -8,0×10 ⁻⁵	2,9×10 ⁻⁷	9,5×10 ⁻⁷	3,8

3.3.2.2 Statistické parametry pro mesalazin

Stejně experimenty byly realizovány i pro 5-ASA, kdy byla opět proměřena řada koncentračních závislostí na všech testovaných BDDE. Na obrázku 56A jsou pro ilustraci vyneseny příslušné závislosti pro 5-ASA v rozsahu koncentrací 5,0×10⁻⁵-4,5×10⁻⁴ mol L⁻¹ pro všechny jednotlivé elektrody. Bylo zjištěno, že i pro 5-ASA hodnota směrnice (Tabulka 21) roste s rostoucím poměrem B/C. Dále byly vypočítány statistické parametry LDR, LOD, LOQ a RSD_{M(11)}, které jsou shrnuty v tabulce 22. Z té vyplývá, že velmi dobré výsledky opět poskytují elektrody s vyšším obsahem boru, konkrétně BDDE 10 000 ppm, která vykazuje i nejširší využitelný koncentrační rozsah. Na obrázku 56B jsou uvedeny SW voltamogramy naměřené v závislosti na koncentraci 5-ASA v modelovém roztoku na této pracovní elektrodě. Pro elektrodu s B/C 20 000 ppm došlo znovu ke zhoršení výsledků, pravděpodobně z důvodu výrazně vyššího pozadí, nižšího poměru signál/šum a také vzhledem k horší opakovatelnosti měření v porovnání s ostatními elektrodami (20 000 ppm: RSD_{M(11)} = 4,3 %, ostatní: RSD_{M(11)} ≤ 1,7 %). Překvapivě dobré výsledky byly získány stejně jako v případě LIN pro elektrodu s B/C 1000 ppm, což může být způsobeno dobrou kvalitou připraveného filmu, velmi nízkým pozadím a vysokým poměrem signál/šum a v neposlední řadě také velmi dobrou linearitou koncentrační závislosti, z níž byly statistické parametry počítány.



Obrázek 56: Koncentrační závislosti 5-ASA v rozsahu $5,0 \times 10^{-5}$ – $4,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ získané na BDDE s poměrem B/C 1000-20 000 ppm (A), příklad odpovídajících SW voltamogramů 5-ASA naměřených na BDDE s poměrem B/C 10 000 ppm (B). Metoda: SWV, BRB (pH 7), $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +1800$ mV, $A = 70$ mV, $f = 25$ Hz.

Tabulka 21 Statistické parametry závislostí I_p [nA] na c [μM] pro 5-ASA z Obr. 56A, $c = 5 \times 10^{-5}$ – 3×10^{-4} mol L⁻¹

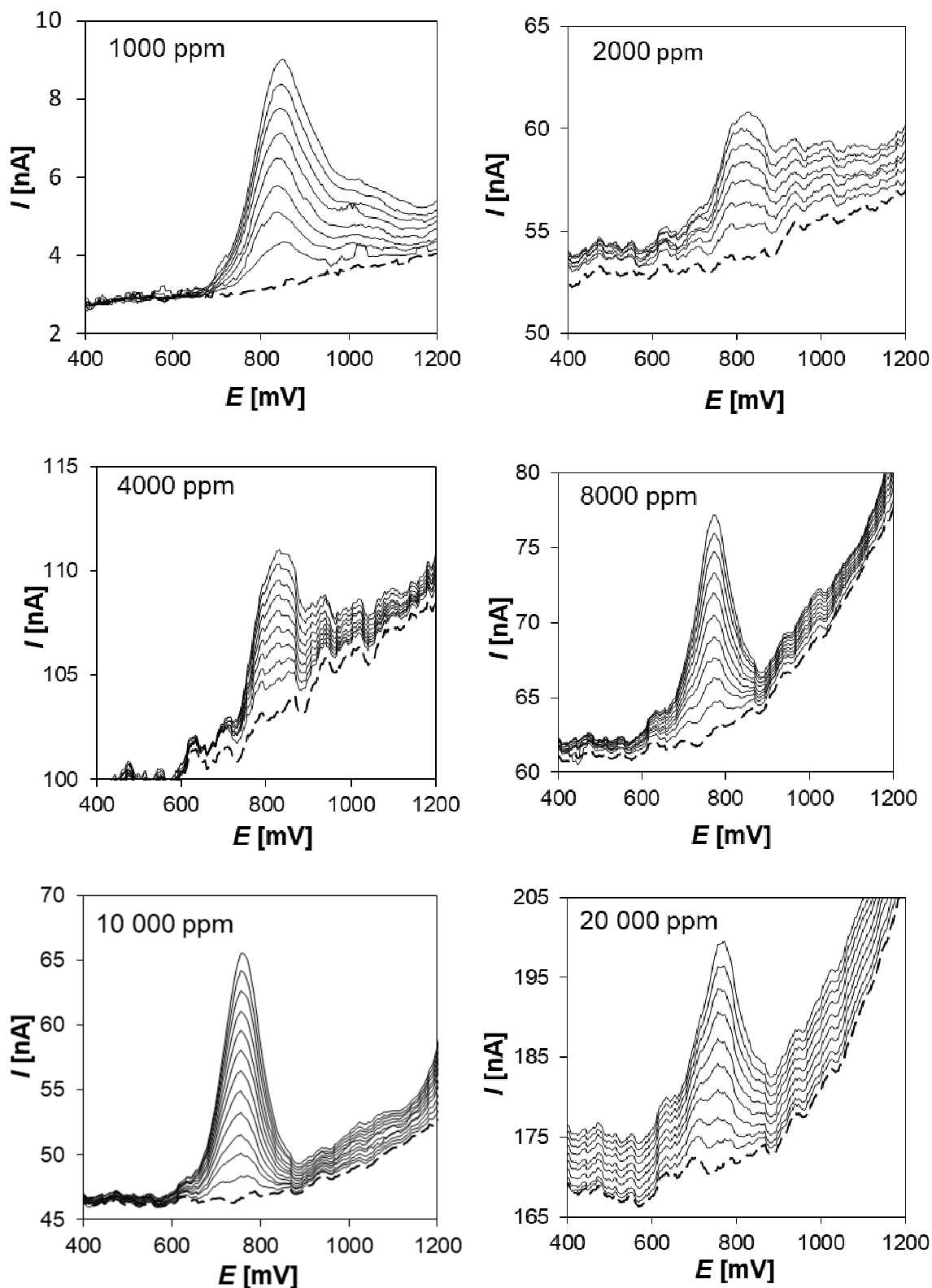
B/C [ppm]	Směrnice [nA μmol L ⁻¹]	Úsek [nA]	<i>r</i>
1000	(0,711±0,016)	(0,4±4,4)	0,9982
2000	(0,8686±0,0046)	(-8,2±1,3)	0,9999
4000	(0,9928±0,0062)	(-20,9±1,7)	0,9998
8000	(1,4047±0,0052)	(-15,2±1,5)	0,9999
10 000	(1,860±0,057)	(-48±15)	0,9986
20 000	(2,458±0,022)	(-33,1±6,3)	0,9996

Tabulka 22 Statistické parametry stanovení 5-ASA s využitím testovaných BDDE, SWV (BRB pH 7) – $E_{\text{poč}} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{kon}} = +1800 \text{ mV}$, $A = 70 \text{ mV}$, $f = 25 \text{ Hz}$

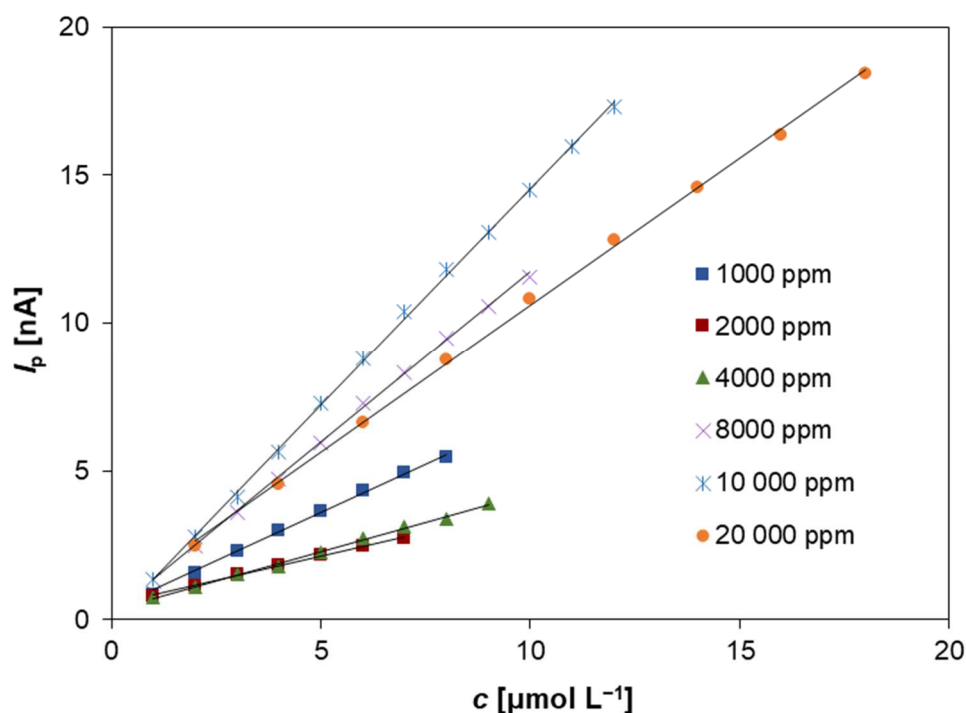
B/C	LDR	LOD	LOQ	RSD_M(11)
[ppm]	[mol L⁻¹]	[mol L⁻¹]	[mol L⁻¹]	[%]
1000	$2,0 \times 10^{-6}$ - $7,0 \times 10^{-4}$	$6,3 \times 10^{-7}$	$2,1 \times 10^{-6}$	1,7
2000	$1,0 \times 10^{-5}$ - $9,0 \times 10^{-4}$	$3,8 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-5}$	0,8
4000	$2,5 \times 10^{-5}$ - $7,0 \times 10^{-4}$	$3,7 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-5}$	1,2
8000	$5,0 \times 10^{-6}$ - $9,0 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-6}$	$5,6 \times 10^{-6}$	1,1
10 000	$2,5 \times 10^{-6}$ - $1,0 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-6}$	$3,7 \times 10^{-6}$	1,3
20 000	$8,0 \times 10^{-5}$ - $1,0 \times 10^{-3}$	$3,1 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-5}$	4,3

3.3.2.3 Statistické parametry pro leukovorin

Poslední látkou, při jejímž stanovení byly aplikovány testované elektrody, byl LV. Ke zjištění základních statistických parametrů byla opět proměřena řada koncentračních závislostí, jejichž příklady pro všechny elektrody v obdobných koncentračních rozsazích v intervalu $1,0 \times 10^{-6}$ - $1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ jsou uvedeny na obrázku 57. Na voltamogramech je patrný rozdíl ve tvaru křivek, pozadí, šumu i velikosti signálů pro jednotlivé elektrody. Např. je zřejmé, že s rostoucím obsahem boru roste pozadí, a to do B/C 4000 ppm. Poté opět klesá pro elektrody 8000 a 10 000 ppm, nicméně elektroda s B/C 20 000 ppm vykazuje opět pozadí velmi vysoké. Navíc je pro křivky naměřené na této elektrodě charakteristický velký šum stejně jako pro křivky 2000 a 4000 ppm. Na obrázku 58 jsou vyneseny odpovídající závislosti I_p na c LV. Ze získaných závislostí je patrné, že nejstrmější přímky jsou pozorovány pro BDDE 8000 a 10 000 ppm, což potvrzují i hodnoty směrnic uvedené v tabulce 23 spolu s dalšími parametry. Hodnota směrnice dosáhla svého maxima pro elektrodu 10 000 ppm a poté byl v souladu s předchozími výsledky opět zjištěn pokles citlivosti (směrnice) pro elektrodu s nejvyšším poměrem B/C (20 000 ppm). Ostatní statistické parametry jako LDR, LOD a LOQ jsou prezentovány v tabulce 24. Ze získaných výsledků vyplývá, že velmi nízké hodnoty LOD byly vypočítány pro elektrody s vyšším obsahem boru (8000 a 10 000 ppm). Konkrétně LOD činil pro elektrodu 8000 ppm $9,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ a pro BDDE 10 000 ppm $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Velmi dobré výsledky a nejnižší LOD byly stejně jako v případě LIN a 5-ASA pozorovány pro BDDE s B/C 1000 ppm, což může být dáno nízkým pozadím a vysokým poměrem signál/šum (obrázek 57). Nejhorší výsledky byly naopak pozorovány pro elektrodu s B/C 20 000 ppm, což rovněž odpovídá předchozím zjištěním.



Obrázek 57: DP voltamogramy LV v závislosti na koncentraci zaznamenané na BDDE s poměrem B/C 1000-20 000 ppm. Metoda: DPV, BRB (pH 3), $E_{\text{poč}} = -700$ mV, $E_{\text{kon}} = +1800$ mV, $v = 40$ mV s⁻¹, výška pulzu = 50 mV, šířka pulzu = 20 ms, $c_{\text{LV}} = 1 \times 10^{-6}$ - 8×10^{-6} mol L⁻¹ (1000 ppm), 1×10^{-6} - 7×10^{-6} mol L⁻¹ (2000 ppm), 1×10^{-6} - 9×10^{-6} mol L⁻¹ (4000 ppm), 1×10^{-6} - 1×10^{-5} mol L⁻¹ (8000 ppm), 1×10^{-6} - $1,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (10 000 ppm) a 2×10^{-6} - $1,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (20 000 ppm).



Obrázek 58: Koncentrační závislosti LV v rozsahu $1,0 \times 10^{-6}$ – $1,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ získané na BDDE s poměrem B/C 1000-20 000 ppm. Metoda: DPV, BRB (pH 3), $E_{\text{poč}} = -700$ mV, $E_{\text{kon}} = +1800$ mV, $\nu = 40$ mV s⁻¹, výška pulzu = 50 mV, šířka pulzu = 20 ms.

Tabulka 23 Statistické parametry závislostí I_p [nA] na c [μM] pro LV z Obr. 58, $c_{\text{LV}} = 1 \times 10^{-6}$ – 8×10^{-6} mol L⁻¹ (1000 ppm), 1×10^{-6} – 7×10^{-6} mol L⁻¹ (2000 ppm), 1×10^{-6} – 9×10^{-6} mol L⁻¹ (4000 ppm), 1×10^{-6} – 1×10^{-5} mol L⁻¹ (8000 ppm), 1×10^{-6} – $1,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (10 000 ppm) a 2×10^{-6} – $1,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (20 000 ppm).

B/C [ppm]	Směrnice [nA μmol L ⁻¹]	Úsek [nA]	<i>r</i>
1000	(0,653±0,010)	(0,339±0,051)	0,9992
2000	(0,3267±0,0088)	(0,499±0,039)	0,9982
4000	(0,3951±0,0065)	(0,312±0,036)	0,9984
8000	(1,1545±0,0098)	(0,176±0,061)	0,9997
10 000	(1,466±0,012)	(0,114±0,085)	0,9997
20 000	(0,983±0,011)	(0,740±0,140)	0,9995

Pro všechny tři testované analyty, lišící se významně chemickou strukturou, bylo dosaženo velmi podobných výsledků. Je zřejmé, že obsah boru v diamantovém filmu významně ovlivňuje vedle elektrochemických vlastností elektrod i jejich možnosti při stanovení konkrétních elektroaktivních látek, zejména pak parametry jako LDR nebo LOD.

V případě všech tří studovaných látek se se zvyšujícím se poměrem B/C zvyšovaly proudové odezvy odpovídající sledovaným oxidačním reakcím a současně docházelo ke zlepšení porovnávaných statistických parametrů. Toto zlepšení však nebylo neomezené, ale pouze do B/C 10 000 ppm. Pro elektrodu s B/C 20 000 ppm následovalo opětovné zhoršení vypočtených hodnot. Překvapivě dobré výsledky byly v aplikační oblasti získány i pro elektrodu s poměrem B/C 1000 ppm, a to v rozporu s předchozími studii zaměřenými na elektrochemické vlastnosti elektrod. Důvodem může být nízké pozadí a vysoký poměr signál/šum, jak je vidět na obrázku 57.

Tabulka 24 Statistické parametry stanovení LV s využitím testovaných BDDE, DPV (BRB pH 3) – $E_{\text{poč}} = -700$ mV, $E_{\text{kon}} = +1800$ mV, $v = 40$ mV s⁻¹, *výška pulzu* = 50 mV, *šířka pulzu* = 20 ms

B/C	LDR	LOD	LOQ	RSD_M(11)
[ppm]	[mol L⁻¹]	[mol L⁻¹]	[mol L⁻¹]	[%]
1000	$2,5 \times 10^{-7}$ - $2,5 \times 10^{-5}$	$6,7 \times 10^{-8}$	$2,2 \times 10^{-7}$	2,0
2000	$1,0 \times 10^{-6}$ - $3,0 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^{-7}$	$1,2 \times 10^{-6}$	1,7
4000	$5,0 \times 10^{-7}$ - $3,0 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-7}$	$3,7 \times 10^{-7}$	1,9
8000	$5,0 \times 10^{-7}$ - $3,5 \times 10^{-5}$	$9,0 \times 10^{-8}$	$3,0 \times 10^{-7}$	3,4
10 000	$5,0 \times 10^{-7}$ - $5,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-7}$	$3,4 \times 10^{-7}$	1,1
20 000	$2,0 \times 10^{-6}$ - $4,0 \times 10^{-5}$	$4,2 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^{-6}$	0,8

3.3.3 Opakované stanovení analytů v modelových roztocích

Posledním parametrem, který byl pro všechny tři biologicky aktivní látky s využitím jednotlivých BDDE testován, byla opakovatelnost stanovení. Pro každou testovanou BDDE byly analyzovány 2 modelové roztoky o různých koncentracích LIN, 5-ASA, resp. LV. Vybrané koncentrace byly zvoleny podle možností každé elektrody a jsou shrnuty v tabulkách 25 (LIN), 26 (5-ASA) a 27 (LV). Jednotlivá stanovení probíhala metodou standardního přídatku, kdy byly vždy přidány 2-3 standardní přídatky. Každé stanovení bylo opakováno 5× a byla vypočtena průměrná hodnota koncentrace testovaných analytů s příslušným intervalem spolehlivosti ($\alpha = 0,05$) a RSD_S(5). Z tabulek 25, 26 a 27 vyplývá, že získané výsledky jsou správné a stanovení jsou velmi dobře opakovatelná ($\text{RSD}_S(5) \leq 3,8$) s využitím všech testovaných BDDE. Analyzované koncentrace ale musely být u některých elektrod (zejm. B/C 20 000 ppm) vyšší s ohledem na dosažené statistické parametry (vyšší LOQ).

Tabulka 25 Opakované stanovení LIN v modelových roztocích s využitím testovaných BDDE, DPV (BRB pH 2) – $E_{\text{poč}} = +400$ mV, $E_{\text{kon}} = +2000$ mV, $v = 50$ mV s⁻¹, *výška pulzu* = 70 mV, *šířka pulzu* = 20 ms

B/C [ppm]	Dáno [mol L ⁻¹]	Stanoveno [mol L ⁻¹]	RSD_s(5) [mol L ⁻¹]
1000	5,0×10 ⁻⁶	(5,010±0,016)×10 ⁻⁶	2,4
	2,5×10 ⁻⁶	(2,49±0,33)×10 ⁻⁶	2,0
2000	5,0×10 ⁻⁶	(4,992±0,077)×10 ⁻⁶	2,3
	2,5×10 ⁻⁶	(2,510±0,052)×10 ⁻⁶	3,2
4000	5,0×10 ⁻⁶	(4,98±0,10)×10 ⁻⁶	3,1
	2,5×10 ⁻⁶	(2,502±0,041)×10 ⁻⁶	2,5
8000	5,0×10 ⁻⁶	(5,010±0,021)×10 ⁻⁶	0,6
	2,5×10 ⁻⁶	(2,521±0,035)×10 ⁻⁶	2,1
10 000	5,0×10 ⁻⁶	(5,012±0,032)×10 ⁻⁶	1,0
	2,5×10 ⁻⁶	(2,5011±0,034)×10 ⁻⁶	2,1
20 000	5,0×10 ⁻⁶	(5,010±0,048)×10 ⁻⁶	1,5
	2,5×10 ⁻⁶	(2,505±0,039)×10 ⁻⁶	2,3

Tabulka 26 Opakované stanovení 5-ASA v modelových roztocích s využitím testovaných BDDE, SWV (BRB pH 7) – $E_{\text{poč}} = 0$ mV, $E_{\text{kon}} = +1800$ mV, $A = 70$ mV, $f = 25$ Hz

B/C [ppm]	Dáno [mol L ⁻¹]	Stanoveno [mol L ⁻¹]	RSD_s(5) [mol L ⁻¹]
1000	5,0×10 ⁻⁵	(4,980±0,028)×10 ⁻⁵	0,9
	5,0×10 ⁻⁶	(5,031±0,076)×10 ⁻⁶	2,3
2000	5,0×10 ⁻⁵	(5,011±0,025)×10 ⁻⁵	0,8
	2,5×10 ⁻⁵	(2,508±0,009)×10 ⁻⁵	0,5
4000	5,0×10 ⁻⁵	(5,020±0,014)×10 ⁻⁵	0,4
	2,5×10 ⁻⁵	(2,501±0,014)×10 ⁻⁵	0,9
8000	5,0×10 ⁻⁵	(5,013±0,019)×10 ⁻⁵	0,6
	2,5×10 ⁻⁵	(2,498±0,013)×10 ⁻⁵	0,8
10 000	5,0×10 ⁻⁵	(5,010±0,018)×10 ⁻⁵	0,5
	5,0×10 ⁻⁶	(5,002±0,039)×10 ⁻⁶	1,2
20 000	5,0×10 ⁻⁵	(4,989±0,034)×10 ⁻⁵	1,0
	2,5×10 ⁻⁵	(2,510±0,022)×10 ⁻⁵	1,3

Tabulka 27 Opakované stanovení LV v modelových roztocích s využitím testovaných BDDE, DPV (BRB pH 3)
 – $E_{\text{poč}} = -700 \text{ mV}$, $E_{\text{kon}} = +1800 \text{ mV}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$, *výška pulzu* = 50 mV, *šířka pulzu* = 20 ms

B/C [ppm]	Dáno [mol L⁻¹]	Stanoveno [mol L⁻¹]	RSD_s(5) [mol L⁻¹]
1000	$3,0 \times 10^{-6}$	$(3,020 \pm 0,030) \times 10^{-6}$	1,5
	$1,0 \times 10^{-6}$	$(1,010 \pm 0,012) \times 10^{-6}$	1,8
2000	$3,0 \times 10^{-6}$	$(3,040 \pm 0,043) \times 10^{-6}$	2,1
	$1,0 \times 10^{-6}$	$(1,020 \pm 0,024) \times 10^{-6}$	3,5
4000	$3,0 \times 10^{-6}$	$(3,020 \pm 0,043) \times 10^{-6}$	2,2
	$1,0 \times 10^{-6}$	$(1,020 \pm 0,025) \times 10^{-6}$	3,7
8000	$3,0 \times 10^{-6}$	$(3,030 \pm 0,031) \times 10^{-6}$	1,5
	$1,0 \times 10^{-6}$	$(1,010 \pm 0,025) \times 10^{-6}$	3,8
10 000	$3,0 \times 10^{-6}$	$(3,020 \pm 0,022) \times 10^{-6}$	1,1
	$1,0 \times 10^{-6}$	$(1,010 \pm 0,011) \times 10^{-6}$	1,7
20 000	$3,0 \times 10^{-6}$	$(3,010 \pm 0,039) \times 10^{-6}$	1,9
	$2,0 \times 10^{-6}$	$(2,000 \pm 0,018) \times 10^{-6}$	1,4

4 Závěr

Předložená disertační práce shrnuje výsledky studie zaměřené na laboratorně připravené BDDE s různým obsahem boru. Byly studovány fyzikální, chemické i elektrochemické vlastnosti těchto elektrod a jejich aplikační možnosti při analýze biologicky aktivních látek. Testované elektrody byly vyrobeny metodou HF CVD a poměr B/C se pohyboval od 1000 do 20 000 ppm. Cílem této práce bylo porovnání konkrétních parametrů získaných pro jednotlivé elektrody v závislosti na obsahu boru v diamantovém filmu.

V úvodu práce bylo studováno voltametrické chování herbicidu LIN a léčiv 5-ASA a LV s využitím komerčně dostupné BDDE a následně byly vyvinuty metody pro jejich stanovení. Bylo zjištěno, že všechny analyty poskytují oxidační signály vhodné pro analytické využití. Pro stanovení LIN byla vybrána metoda DPV, byly optimalizovány její parametry a dosaženy následující statistické parametry: LDR $5,0 \times 10^{-7}$ - $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, LOD $1,4 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ a LOQ $4,7 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Metoda byla úspěšně aplikována při analýze říční vody. Pro vývoj metody stanovení 5-ASA byla využita SWV. Po optimalizaci parametrů byl získán LDR $2,0 \times 10^{-6}$ - $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, LOD $7,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ a LOQ $2,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Aplikační možnosti navržené metody byly ověřeny analýzou farmaceutického přípravku Pentasa® a vzorku lidské moči. Pro stanovení LV sloužila DPV a byly dosaženy statistické parametry LDR $1,5 \times 10^{-7}$ - $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, LOD $1,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ a LOQ $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Vyvinutá metoda byla použita při analýze farmaceutického přípravku Leucovorin Ca LACHEMA 10. Metody navržené pomocí komerčně dostupné BDDE byly v další fázi práce aplikovány v kombinaci s testovanými elektrodami.

Stěžejní část disertační práce byla věnována charakterizaci elektrod s různým obsahem boru, resp. poměrem B/C. Nejprve byl charakterizován jejich povrch s využitím SEM a Ramanovy spektroskopie. Pro elektrochemickou charakterizaci byla využívána EIS a CV reverzibilních redoxních systémů $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$. Bylo zjištěno, že film tvoří na povrchu substrátu kompaktní souvislou vrstvu a se zvyšujícím se obsahem boru se zvětšuje velikost zrn ve struktuře materiálu. Ramanova spektroskopie prokázala tvorbu BDD filmů, kdy byla např. pozorována dvě maxima přibližně při 470 a 1220 cm⁻¹ související se zabudováním boru do mřížky diamantu, která se zvyšujícím se obsahem boru narůstala. S využitím EIS bylo pozorováno snížení impedance s rostoucí úrovní dopování borem. To znamená, že přenos elektronu je mnohem snazší, resp. rychlejší se zvyšujícím se poměrem B/C. Pro podrobnější elektrochemickou charakterizaci byly změřeny cyklické voltamogramy $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ na všech testovaných elektrodách v prostředí 0,1 mol L⁻¹

KCl, a to i v závislosti na rychlosti polarizace. Bylo zjištěno, že se zvyšujícím se poměrem B/C dochází k zužování využitelného potenciálového okna (celkem o cca 900 mV mezi elektrodami s B/C 1000 a 20 000 ppm). Současně se zvyšovala reverzibilita sledovaných elektrodoových reakcí. Nejlepší elektrochemické vlastnosti byly pozorovány u elektrody 10 000 ppm, která vykazovala nejnižší hodnoty ΔE_p , poměry I_{pa}/I_{pc} pro oba systémy blízké 1, nejvyšší hodnoty k_{app}^0 a největší elektroaktivní plochu. U elektrody s obsahem boru 20 000 ppm bylo pozorováno zhoršení všech sledovaných parametrů, pravděpodobně v důsledku zvýšené přítomnosti nečistot ve formě sp^2 uhlíku, resp. zhoršení fyzikálně-chemických vlastností BDD filmu.

Na závěr byly testovány aplikační možnosti BDDE s různým poměrem B/C při analýze výše uvedených bioaktivních látek s využitím metod vyvinutých v kombinaci s komerčně dostupnou BDDE. Pro LIN, 5-ASA i LV byly dosaženy velmi podobné výsledky, i když se jedná o látky, jež se liší chemickou strukturou, resp. mechanismem probíhajících oxidačních reakcí. Ve všech případech byly podle očekávání dosaženy nejlepší statistické parametry pro elektrody s vyšším obsahem boru (8000 či 10 000 ppm). Zhoršení výsledků pak bylo pozorováno u elektrody 20 000 ppm, což odpovídá předchozím zjištěním. Překvapivě dobré výsledky byly v aplikační oblasti získány i pro elektrodu s poměrem B/C 1000 ppm, a to v rozporu s předchozími studiemi zaměřenými na elektrochemické vlastnosti elektrod. Nízké hodnoty LOD, resp. LOQ pro tuto elektrodu byly srovnatelné s elektrodou s B/C 10 000 ppm, přestože elektrochemické vlastnosti (např.: ΔE_p , k_{app}^0) vykazovala tato elektroda podstatně horší. Mnohem nižší byla i intenzita sledovaných proudových signálů.

Na závěr lze říci, že obsah boru v BDD filmu významně ovlivňuje elektrochemické vlastnosti vyrobených pracovních elektrod. Nejlepší výsledky byly dosaženy u elektrod s vyšším poměrem B/C, konkrétně 8000 a 10 000 ppm. Další zvýšení B/C již další zlepšení parametrů nepřineslo, spíše naopak. V aplikační oblasti mohla konkurovat svými statistickými parametry i elektroda 1000 ppm, ale při analýze nižších koncentrací již byly píky velmi malé a špatně vyhodnotitelné.

Seznam použité literatury

1. Heyrovsky, J.: *Elektrolýsa se rtuťovou kapkovou elektrodou*. Chemické Listy, č. 16, s. 256-264 (1922).
2. Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava, 132 s., 2003, ISBN 8086369072.
3. Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského. www.jh-inst.cas.cz [online]. [cit. 2018-07-07]. Dostupné z: <http://www.jh-inst.cas.cz/www/detail.php?p=2>
4. Příběh kapky, Jaroslav Heyrovský, první český Nobelista. www.jh-inst.cas.cz [online]. [cit. 2018-07-07]. Dostupné z: <https://www.jh-inst.cas.cz/heyrovsky/>
5. Kotrlý, S., Churáček, J.: *Analytická chemie III – elektroanalytické metody*. Vyd. 1. Pardubice: Vysoká škola chemicko-technologická, 82 s., 1984.
6. Opekar, F. a kol.: *Základní analytická chemie*. Praha: Karolinum, 2003, 208 s., ISBN 80-246-0553-8.
7. Barek, J.: *Postavení polarografie a voltametrie na rtuťových kapkových elektrodách v moderní analytické chemii*. Chemické Listy, č. 91, s. 1038-1042 (1997).
8. VOLTAMETRIC METHODS. In: ChemWiki: Think outside the book. University of California: UC Davis, 2013. <https://chem.libretexts.org/> [online]. [cit. 2018-07-07]. Dostupné z: http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.0/1_1_Electrochemical_Methods/11D%3A_Voltammetric_Methods
9. Barek, J. a kol.: *Kam směřují moderní elektroanalytické metody 50 let po udělení Nobelovy ceny za polarografii*. Chemické Listy, č. 103, s. 889-893 (2009).
10. Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1907/2006, o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnic Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES. Prosinec 2006.
11. Nařízení komise EU č. 847/2012, kterým se mění příloha XVII nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (REACH), pokud jde o rtuť. Září 2012.
12. Barek, J., a kol.: *Elektroanalytická chemie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005, 188 s., ISBN: 80-246-1146-5.

13. ALS Co., Ltd. Electrochemistry and Spectroelectrochemistry. www.als-japan.com [online]. [cit. 2018-07-07]. Dostupné z: <https://www.als-japan.com/1359.html#verticalTab12>
14. Pumera, M.: *The Electrochemistry of Carbon Nanotubes: Fundamentals and Applications*. Chemistry a European Journal, v. 15, p. 4970-4978 (2009).
15. Li, D., Kaner, R. B.: *Graphene-Based Materials*. Science, v. 320, p. 1170-1171 (2008).
16. Geim, A. K., Novoselov, K. S.: *The rise of graphene*. Nature Materials, v. 6, p. 183-191 (2007).
17. Shan, Ch., et al.: *Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on graphene*. Analytical Chemistry, v. 81, p. 2378-2382 (2009).
18. Wang, J., Lin., Y. H.: *Functionalized carbon nanotubes and nanofibers for biosensing applications*. Trends in Analytical Chemistry, v. 27, p. 619-626 (2008).
19. Friedrich, J. M., et al.: *Reticulated vitreous carbon as an electrode material*. Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 561, p. 203-217 (2004).
20. Jia, J., et al.: *Structure and electrochemical properties of carbon films prepared by a electron cyclotron resonance sputtering method*. Analytical Chemistry, v. 79, p. 98-105 (2007).
21. Joo, S. H., et al.: *Ordered nanoporous arrays of carbon supporting high dispersions of platinum nanoparticles*. Nature, v. 412, p. 169-172 (2001).
22. Kowalski, Z.: Polish Patent No. P-319 984 (1997).
23. Baś, B., Kowalski, Z.: *Preparation of silver surface for mercury film electrode of prolonged analytical application*. Electroanalysis, v. 14, p. 1067-1071 (2002).
24. Kapturski, P., Bobrowski, A.: *Silver amalgam film electrode of prolonged application in stripping chronopotentiometry*. Electroanalysis, v. 19, p. 1863-1868 (2007).
25. Baś, B.: *Refreshable mercury film silver based electrode for determination of chromium(VI) using adsorptive stripping voltammetry*. Analytica Chimica Acta, v. 570, p. 195-201 (2006).
26. Furman, N. H., Cooper, W. Ch.: *A study of the polarographic behavior of dropping amalgam electrode*. Journal of the American Chemical Society, v. 72, p. 5667-5676 (1950).
27. Cooper, W. Ch.: *The polarographic behavior of dropping tin amalgam electrode*. Journal of the American Chemical Society, v. 77, p. 2074-2076 (1954).

28. Mendez, J. H., et al.: *Polarographic determination of glycine with a dropping copper amalgam electrode*. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, v. 66, p. 53-65 (1975).
29. Bilewicz, R., Kublik, Z.: *The cathodic stripping voltammetric determination of traces of iodide with a hanging copper amalgam drop electrode*. Analytica Chimica Acta, v. 171, p. 205-213 (1985).
30. Perez, A. S., et al.: *Polarographic determination of phenylalanine, tyrosine, methionine, glutamic acid and histidine with a dropping copper amalgam electrode*. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, v. 74, p. 339-346 (1976).
31. W. Opoka, B. Baś, W. Reczyński, M. Plonka, D. Drozdowicz, Z. Śliwowski, T. Brzozowski: *Applicability of the silver amalgam electrode in voltammetric determination of zinc and copper in gastric juice and gastric mucosa of rats*. Acta Pol. Pharm. 68, 481-492 (2011).
32. Mikkelsen, Ø., Schrøder, K. H.: *Dental amalgam in voltammetry. Some preliminary results*. Analytical Letters, č. 33 (2000).
33. Novotný, L., Yosypchuk, B.: *Pevné stříbrné amalgamové elektrody*. Chemické Listy, č. 94, s. 1118-1120 (2000).
34. Mikkelsen, Ø., et al.: *Dental amalgam, an alternative electrode material for voltammetric analyses of pollutants*. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, v. 66, p. 465-472 (2001).
35. Mikkelsen, Ø., Schrøder, K. H.: *Voltammetry using a dental amalgam electrode for heavy metal monitoring of wines and spirits*. Analytica Chimica Acta, v. 458, p. 249-256, (2002).
36. Šelešovská, R.: *Možnosti stříbrné pevné amalgamové elektrody v oblasti analýzy bioaktivních látek*. Habilitační práce. Univerzita Pardubice. Pardubice (2014).
37. Yosypchuk, B., Barek, J.: *Analytical Applications of Solid and Paste Amalgam Electrodes*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, v.39, p. 189–203 (2009).
38. Yosypchuk, B., Barek, J.: *Vlastnosti pevných a pastových amalgamových pracovních elektrod odlišné od elektrod z kovové rtuti*. Chemické Listy, č. 103, s. 284-290 (2009).
39. Yosypchuk, B., Šestáková, I.: *Working electrodes from amalgam paste for electrochemical measurements*. Electroanalysis, v. 20, p. 426-433 (2008).

40. Yosypchuk, B., et al.: *Solid amalgam composite electrode as a new sensor for the determination of biologically active compounds*. Chemia Analityczna (Warsaw), v. 52, p. 897-910 (2007).
41. Daňhel, A. et al.: *Crystalline silver amalgam – a novel electrode material*. Analyst, v. 136, p. 3656-3662 (2012).
42. Yosypchuk, B., Novotný, L.: *Electrodes of Nontoxic Solid Amalgams for Electrochemical Measurements*. Electroanalysis, v. 14, p. 1733-1738 (2002).
43. Yosypchuk, B. et al.: *Carbon powder based films on traditional solid electrodes as an alternative to disposable electrodes*. Electroanalysis, v.18, p. 1126-1130 (2006).
44. Vyskočil, V. a kol.: *Kráska a užitečnost nových elektrodových materiálů*. Chemické Listy, č. 104, s. 1181-1195 (2010).
45. de Souza, D., et al.: *Utilization of a copper solid amalgam electrode for the analytical determination of atrazine*. Electroanalysis, v. 17, p. 2090-2094 (2005).
46. Kokkinos, Ch., et al. *Novel disposable bismuth-sputtered electrodes for the determination of trace metals by stripping voltammetry*. Electrochemistry communications, v. 9, p. 2795-2800 (2007).
47. Królicka, A., Bobrowski, A.: *Bismuth film electrode for adsorptive stripping voltammetry – electrochemical and microscopic study*. Electrochemistry Communications, v. 6, p. 99-104 (2004).
48. Švancara, I., Vytrás, K.: *Elektroanalýza s bismutovými elektrodami*. Chemické Listy, č. 100, s. 90-113 (2006).
49. Wang, J., et al.: *Bismuth-coated carbon electrodes for anodic stripping voltammetry*. Analytical Chemistry, v. 72, p. 3218-3222 (2000).
50. Hutton, E. A., et al.: *An introduction to bismuth film electrode for use in cathodic electrochemical detection*. Electrochemistry Communications, v. 3, p. 707-711 (2001).
51. Charalambus, A., Economou, A.: *A study on the utility of bismuth-film electrodes for the determination of In(III) in the presence of Pb(II) and Cd(II) by square wave anodic stripping voltammetry*. Analytica Chimica Acta, v. 547, p. 53-58 (2005).
52. Banks, C. E., et al.: *Manganese detection in marine sediments: anodic vs. cathodic stripping voltammetry*. Talanta, v. 65, p. 423-429 (2005).
53. Vytrás, K., et al.: *Novelty in Potentiometric Stripping Analysis: Total Replacement of Mercury by Bismuth*. Electroanalysis, v. 14, p. 1359-1364 (2002).

54. Kefala, G., et al.: *Determination of trace aluminium by adsorptive stripping voltammetry on a preplated bismuth-film electrode in the presence of cupferron*. Talanta, v. 68, p. 1013-1019 (2006).
55. Hutton, E. A., et al.: *Bismuth film microelectrode for direct voltammetric measurement of trace cobalt and nickel in some simulated and real body fluid samples*. Analytica Chimica Acta, v. 557, p. 57-63 (2006).
56. Wang, J., et al.: *Bismuth-Coated Screen-Printed Electrodes for Stripping Voltammetric Measurements of Trace Lead*. Electroanalysis, v. 13, p. 13-16 (2001).
57. Deýlová, D., et al.: *A New Type of Large-Surface Bismuth Film Electrode on a Silver Solid Amalgam Substrate and its Application for the Voltammetric Determination of 5-Nitrobenzimidazole*. International Journal of Electrochemical Science, v. 9, p. 4653-4664 (2014).
58. Deýlová, D., et al.: *Bismuth film electrode at a silver solid amalgam substrate as a new tool for voltammetric determination of electrochemically reducible organic compounds*. Talanta, v. 102, p. 68-74 (2012).
59. Economou, A.: *Bismuth-film electrodes: recent developments and potentialities for electroanalysis*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 24, p. 334-340 (2005).
60. Adams, R. N.: *Carbon Paste Electrodes*. Analytical Chemistry, v. 30, p. 1576-1576 (1958).
61. Wang, Z. a kol.: *Electrochemical detection of trace cadmium in soil using a Nafion/stannum film-modified molecular wire carbon paste electrodes*. Ionics, v. 19, p. 1687-1693 (2013).
62. Petersen, S. L., Tallman, D. E.: *Silver composite electrode for voltammetry*. Analytical Chemistry, v. 60, p. 82-86 (1988).
63. Tallman, D. F., Petersen, S. L.: *Composite electrodes for electroanalysis: Principles and applications*. Electroanalysis, v. 2, p. 499-510 (1990).
64. Navrátil, T.: *Composite solid electrodes - Tool for organic electrochemistry*. Current Organic Chemistry, v. 15, p. 3029-3042 (2011).
65. Navratil, T.: *Kompozitní elektrody*. In: J. Barek a kol.: *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii*, str. 113-118. Pražské analytické centrum inovací, Praha (2006).
66. Navrátil, T.: *Kompozitní elektrody*. In: K. Štulík, J. Barek: *Senzory*, str. 53-60. Pražské analytické centrum inovací, Praha (2007).

67. Navrátil, T., Kopanica, M.: *Analytical Application of Silver Composite Electrode*. Critical Review in Analytical Chemistry, v. 32, p. 153-166 (2002).
68. Navrátil, T., Barek, J.: *Analytical Application of Composite Solid Electrode*. Critical Review in Analytical Chemistry, v. 39, p. 131-147 (2009).
69. Dědík, J. a kol.: *Voltametrická a ampérometrická detekce amino derivátů bifenylu a naftalenu na sítotiskové uhlíkové elektrodě*. Chemické Listy, č. 106, s. 7– 10 (2012).
70. DROPSSENS. <http://www.dropsens.com> [online]. [cit. 2018-07-07]. Dostupné z: http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html
71. Swain G. M., Ramesham R.: *The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline thin-film electrodes*. Analytical Chemistry, v. 65, p. 345-351 (1993).
72. Chailapakul O., et al.: *Boron-Doped Diamond-Based Sensors: A Review*. Sensors Letters, v. 4, p. 99-119 (2006).
73. Compton R. G., et al.: *Electroanalysis at Diamond-Like and Doped-Diamond Electrodes*. Electroanalysis, v. 15, p. 1349-1363 (2003).
74. Iwaki, M. et al.: *Electrical conductivity of nitrogen and argon implanted diamond*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, v. 209, p. 1129-1133 (1983).
75. Vyskočil, V. a kol.: *Krása a užitečnost nových elektrodových materiálů*. Chemické Listy, č. 104, s. 1181-1195 (2010).
76. Kraft, A.: *Doped diamond: A compact review on a new, versatile electrode material*. International journal of electrochemical science, v. 2, p. 355-385 (2007).
77. Zavázalová, J. et al.: *Boron doped diamond electrodes in voltammetry: New designs and applications. An Overview*. Sensing in Electroanalysis, v. 8, p. 21-34 (2013/2014).
78. Suffredini, H. B., et al.: *Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment*. Electrochimica Acta, v. 49, p. 4021-4026 (2004).
79. Pleskov Yu. V.: *Electrochemistry of Diamond: A Review*. Russian Journal of Electrochemistry, v. 38, p. 1275-1291 (2002).
80. Yang, W. S. et al.: *DNA-modified nanocrystalline diamond thin-film as stable, biologically active substrates*. Nature Materials, v. 1, p. 253-257 (2002).
81. Pecková, K. a kol.: *Boron-Doped Diamond Film Electrodes – New Tool for Voltammetric Determination of Organic Substances*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, v. 39, p. 148-172 (2009).

82. Ferreira N. G., et al.: *Kinetic study diamond electrodes at different levels of boron doping as quasi-reversible systems*. *Diamond and Related Materials*, v. 11, p. 1523-1531 (2002).
83. Matsushima, J. T., et al.: *The influence of boron content on electroanalytical detection of nitrate using BDD electrodes*. *Applied Surface Science*, v. 256, p. 757-762 (2009).
84. Fenga, Y., et al.: *Influence of boron concentration on growth characteristic and electro-catalytic performance of boron-doped diamond electrodes prepared by direct current plasma chemical vapor deposition*. *Applied Surface Science*, v. 257, p. 3433-3439 (2011).
85. Wei, J. J., et al.: *The influence of boron doping level on quality and stability of diamond film on Ti substrate*. *Applied Surface Science*, v. 258, p. 6909-6913 (2012).
86. Vlckova Zivcova, Z., et al.: *Electrochemistry and in situ Raman spectroelectrochemistry of low and high quality boron doped diamond layers in aqueous electrolyte solution*. *Electrochimica Acta*, v. 87, p. 518-525 (2013).
87. Schwartzová-Pecková, K., et al.: *Influence of boron content on the morphological, spectral, and electroanalytical characteristics of anodically oxidized boron-doped diamond electrodes*. *Electrochimica Acta*, v. 243, p. 170-182 (2017).
88. Kubínek, R., a kol.: *Mikroskopie skenující sondou*. 1. vyd. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 145 s., 2003, ISBN 80-244-0602-0.
89. Kopecká J.: Laboratoř charakterizace nano a mikrosystémů – *Elektronová mikroskopie* [cit. 2017-11-28] [online]. Dostupné z: <https://fchi.vscht.cz/files/uzel/0010367/EM.pdf?redirected>
90. Tatarkovič, M., a kol.: *Elektroimpedanční spektroskopie a její využití v chemické analýze*. *Chemické Listy*, č. 106, s. 1067-1074 (2012).
91. Chen, P., McCreery, R. L.: *Control of Electron Transfer Kinetics at Glassy Carbon Electrodes by Specific Surface Modification*. *Analytical Chemistry*, v. 68, p. 3958-3965 (1996).
92. Fischer, A. E., et al.: *Electrochemical Performance of Diamond Thin-Film Electrodes from Different Commercial Sources*. *Analytical Chemistry*, v. 76, p. 2553-2560 (2004).
93. Watanabe, T., et al.: *Giant electric double-layer capacitance of heavily boron-doped diamond electrode*. *Diamond and Related Materials*, v. 19, p. 772-777 (2010).

94. Vosáhllová J.: *Vliv koncentrace bóru na elektrochemické vlastnosti bórem dopovaných diamantových elektrod v elektroanalýze*. Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, s. 47, 2013.
95. Salazar-Banda G. R., et al.: *Ultramicroelectrode array behavior of electrochemically partially blocked boron-doped diamond surface*. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 24, p. 1206-1211 (2013).
96. Hutton L. A., et al.: *Examination of the Factors Affecting the Electrochemical Performance of Oxygen-Terminated Polycrystalline Boron-Doped Diamond Electrodes*. Analytical Chemistry, v. 85, p. 7230-7240(2013).
97. Nicholson, R. S.: *Theory and Application of Cyclic Voltammetry for Measurement of Electrode Reaction Kinetics*. Analytical Chemistry, v. 37, p. 1351-1355 (1965).
98. Granger, M. C., Swain, G. M.: *The influence of surface interactions on the reversibility of Ferri/Ferrocyanide at boron-doped diamond thin-film electrodes*, Journal of the Electrochemical Society, v. 146, p. 4551-4558 (1999).
99. Fabianska, A., et al.: *Electrochemical oxidation of sulphamerazine at boron doped diamond electrodes: Influence of boron concentration*. Physica Status Solidi A, v. 210, p. 2040-2047 (2013).
100. Bogdanowicz, R., et al.: *Influence of the boron doping level on the electrochemical oxidation of the azo dyes at Si/BDD thin film electrodes*. Diamond and Related Materials, v. 39, p. 82-88 (2013).
101. Guinea, E., et al.: *Electrocatalytic properties of diamond in the oxidation of persistent pollutant*. Applied Catalysis B, v 89, p. 645-650 (2009).
102. Švorc, L., et al.: *Green electrochemical sensor for environmental monitoring of pesticides: Determination of atrazine in river waters using a boron-doped diamond electrode*. Sens Actuators B, v. 181, p. 294-300 (2013).
103. Janíková-Bandžuchová, L. et al.: *Sensitive voltammetric method for rapid determination of pyridine herbicide triclopyr on bare boron-doped diamond electrode*. Electrochimica Acta, v. 154, p. 421-429 (2015).
104. Šelešovská, R. et al.: *Sensitive voltammetric determination of herbicide terbutryn using solid electrodes based on silver amalgam and boron-doped diamond*. Monatshefte für chemie – Chemical Monthly, v.147, p.207-217 (2016).
105. Rao, T. N. et al.: *Electrochemical Detection of Carbamate Pesticides at Conductive Diamond Electrodes*. Analytical Chemistry, v.74, p.1578-1583 (2002).

106. Wangfuengkanagul, N., Chailapakul, O.: *Electrochemical analysis of acetaminophen using a boron-doped diamond thin film electrode applied to flow injection system*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.28, p.841-847 (2002).
107. Sartori, E. R. et al.: *Square-wave voltammetric determination of propranolol and atenolol in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode*. Talanta, v.81, p.1418-1424 (2010).
108. Šelešovská, R.: *Sensitive Voltammetric Sensor Based on Boron-Doped Diamond Electrode for Determination of the Chemotherapeutic Drug Methotrexate in Pharmaceutical and Biological Samples*. Electroanalysis, v.27, p.42-51 (2015).
109. Huang, L. C. L., Chang, H. C.: *Adsorption and immobilization of cytochrome c on nanodiamonds*. Langmuir, v. 20, p. 5879-5884 (2004).
110. Yang, W. S. et al.: *DNA-modified nanocrystalline diamond thin-film as stable, biologically active substrates*. Nature Materials, v. 1, p. 253-257 (2002).
111. Troupe, C. E., et al.: *Diamond-based glucose sensors*. Diamond and Related Materials, v. 7, p. 575-580 (1998).
112. EXTOKNET: [cit. 2017-08-23] [online]. Dostupné z: <http://extoknet.orst.edu/pips/linuron.htm>
113. SIGMA ALDRICH: Bezpečnostní list. [Http://www.sigmaaldrich.com/](http://www.sigmaaldrich.com/) [online]. [cit. 2017-08-23]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=36141&brand=SIAL&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Fterm%3Dlinuron%26interface%3DAI%26N%3D0%26mode%3Dmatch%2520partialmax%26lang%3Den%26region%3DCZ%26focus%3Dproduct>
114. EPA: R.E.D Facts. [cit. 2017-08-23] [online]. Dostupné z: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-035506_1-Mar-95.pdf
115. Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 2017/244, kterým se v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh neobnovuje schválení účinné látky linuron a kterým se mění příloha prováděcího nařízení Komise (EU) č. 540/2011 (10. 2. 2017).
116. Sá, E. S., et al.: *Electrochemical sensor based on bismuth-film electrode for voltammetric studies on vitamin B₂ (riboflavin)*. Sensors and Actuators B –Chemical, v. 209, p. 423-430 (2015).

117. Hernandez, P., et al.: *Voltammetric Determination of Linuron at a Carbon-Paste Electrode modified with Sepiolite*. *Talanta*, v. 37, p. 789-794 (1990).
118. De Lima, F., et al.: *Determination of Linuron in Water and Vegetables Samples Using Stripping Voltammetry with a Carbon Paste Electrode*. *Talanta*, v. 83, p. 1763-1768 (2011).
119. Đorđević, J., et al.: *Voltammetric Determination of the Herbicide Linuron Using a Tricresyl Phosphate-Based Carbon Paste Electrode*. *Sensors*, v. 12, p. 148-161 (2012).
120. De la Huebra, M. J. G., et al.: *Determination of Linuron in Soil by Stripping Voltammetry with a Carbon Fiber Microelectrode*. *Talanta*, v. 54, p. 1077-1085 (2001).
121. De la Huebra, M. J. G., et al.: *Rapid Identification of Carbendazim and Linuron by Adsorptive Stripping on a Carbon Fiber Ultramicroelectrode*. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v. 368, p. 853-856 (2000).
122. Đorđević, J., et al.: *Glassy Carbon and Boron Doped Glassy Carbon Electrodes for Voltammetric Determination of Linuron Herbicide in the Selected Samples*. *Central European Journal of Chemistry*, v. 10, p. 1271-1279 (2012).
123. Figueiredo-Filho, L. C. S., et al.: *Electroanalytical Determination of the Linuron Herbicide Using a Cathodically Pretreated Boron Doped Diamond Electrode: Comparison with a Boron-Doped Diamond Electrode Modified with Platinum Nanoparticles*. *Analytical Methods*, v. 7, p. 643-649 (2015).
124. Červenková, R.: *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. Praha: Galén, 111 s. (2009) ISBN 978-80-7262-600-7
125. SIGMA ALDRICH: [Http://www.sigmaaldrich.com/](http://www.sigmaaldrich.com/) [online]. [cit. 2017-11-01]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/y0000297?lang=en®ion=CZ>
126. Střevní záněty: <https://www.strevni-zanety.cz/> [online]. [cit. 2017-11-01]. Dostupné z: <https://www.strevni-zanety.cz/novinky/na-crohna-i-kolitidu-plati-mesalazin-v-jakekoli-podobe-7>
127. Keil, R., et. al.: *Vybrané kapitoly z gastroenterologie*. Praha: Karolinum, 86 s. (2012) ISBN 978-80-246-1970-5
128. Marek, J., et al.: *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. Praha: Grada., 777 s. (2005) ISBN 80-247-0839-6.

129. Palsmeier, R. K., et al.: *Investigation of the degradation mechanism of 5-aminosalicylic acid in aqueous solution*. *Pharmaceutical Research*, v. 9, s. 933–938 (1992).
130. Shahrokhian, S., et al.: *Investigation of the electrochemical behavior of mesalazine on the surface of a glassy carbon electrode modified with CNT/PPY doped by 1,5-naphthalenedisulfonic acid*. *Electroanalysis*, v. 25, p. 2481-2491 (2013).
131. Nigović, B., Šimunić, B.: *Determination of 5-aminosalicylic acid in pharmaceutical formulation by differential pulse voltammetry*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 31, p. 169-174 (2003).
132. Beckett, E. L., et al.: *Sonoelectrochemically enhanced determination of 5-aminosalicylic acid*. *Talanta*, v. 54, p. 871–877 (2001).
133. Nigović, B., et al.: *Electrochemical sensing of mesalazine and its N-acetylated metabolite in biological samples using functionalized carbon nanotubes*. *Talanta*, v. 147, p. 50-58 (2016).
134. Uliana, C. V., et al.: *Determination of 5-aminosalicylic acid in pharmaceutical formulations by square wave voltammetry at pencil graphite electrodes*. *Quimica Nova*, v. 33, p. 964-967 (2010).
135. Teradale, A. B., et al.: *CTAB immobilized carbon paste electrode for the determination of mesalazine: A cyclic voltammetric method*. *Sensing and Bio-Sensing Research*, v. 15, p. 53-59 (2017).
136. Jolivet, J.: *Role of Leucovorin Dosing and Administration Schedule*. *European Journal of Cancer*, v. 31, p. 1311-1315 (1995).
137. Jolivet, J., et al.: *The Pharmacology and Clinical Use of Methotrexate*. *The New England Journal of Medicine*, v. 309, p. 1094-1104 (1983).
138. Nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1272/2008 *o klasifikaci, označování a balení látek a směsí*. Prosinec 2008.
139. Šelešovská, R. a kol.: *Voltammetric determination of leucovorin using silver solid amalgam electrode*. *Electrochimica Acta*, v. 60, p. 375-383 (2012).
140. Bleyer, W. A.: *The clinical Pharmacology of Methotrexate*. *Cancer*, v. 41, p. 36-51 (1978).
141. Martínková, J., a kol.: *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Grada, Praha 2007, s. 347, ISBN 978-802-4713-564.

142. Stejskal, D., Heyrovský, M.: *Vyvinutí metod vyšetření metabolismu kyseliny listové pomocí polarografické analýzy. Závěrečná zpráva projektu (reg. č.: 1544-2). Všeobecná Fakultní Nemocnice, Praha 2 (1993-1994).*
143. Zhu, Z., et al.: *Simultaneous determination of methotrexate and calcium folinate with electrochemical method based on a poly-ABSA/functionalized MWNTs composite film modified electrode.* Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 708, p. 13-19 (2013).
144. Kovach, P. M., et al.: *Electrochemistry at Partially Blocked Carbon-Fiber Microcylinder Electrodes.* The Journal of Physical Chemistry, v. 90, p. 4612-4617 (1986).
145. Quereshia, A. I, Cohenb, R. D.: *Mesalamine delivery systems: do they really make much difference?* Advanced Drug Delivery Reviews, v. 57, p. 281-302 (2005).
146. Oliveira, S. C. B., Oliveira-Brett, A. M.: *Voltammetric and electrochemical impedance spectroscopy characterization of a cathodic and anodic pre-treated boron doped diamond electrode.* Electrochimica Acta, v. 55, p. 4599-4605 (2010).
147. Becker, D., Juttner, K.: *The impedance of fast charge transfer reactions on boron doped diamond electrodes.* Electrochimica Acta, v. 49, p. 29-39 (2003).
148. Baldan, M. R., et al.: *Cathodic and anodic pre-treated boron doped diamond with different sp² content: Morphological, structural, and impedance spectroscopy characterizations.* Journal of Physics and Chemistry of Solids, v. 74, p. 1830-1835 (2013).

Příloha 1

Přehled publikační činnosti autorky

Články v odborných časopisech s IF související s tématem disertační práce

1. Renáta Šelešovská, Michaela Štěpánková, Lenka Janíková, Kateřina Nováková, Marian Vojs, Marián Marton, Miroslav Behúl: *Surface and electrochemical characterization of boron-doped diamond electrodes prepared under different conditions*. Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly 147, 1353-1364, 2016. IF 1,285
2. Michaela Štěpánková, Renáta Šelešovská, Lenka Janíková, Jaromíra Chýlková: *Voltammetric determination of mesalazine in pharmaceutical preparations and biological samples using boron-doped diamond electrode*. Chemical Papers 71, 1419-1427, 2017. IF 0,963
3. Michaela Štěpánková, Renáta Šelešovská, Lenka Janíková, Pavlína Martinková, Marián Marton, Pavol Michniak, Jaromíra Chýlková: *Porovnání borem dopovaných diamantových elektrod s různým obsahem boru při stanovení herbicidu linuronu a léčiva mesalazinu*. Chemické Listy 112, 389-395, 2018. IF 0,260
4. Renáta Šelešovská, Barbora Kränková, Michaela Štěpánková, Pavlína Martinková, Lenka Janíková, Jaromíra Chýlková, Marian Vojs: *Influence of boron content on electrochemical properties of boron-doped diamond electrodes and their utilization for leucovorin determination*. Journal of Electroanalytical Chemistry 821, 2-9, 2018. IF 3,235
5. Renáta Šelešovská, Barbora Kränková, Michaela Štěpánková, Pavlína Martinková, Lenka Janíková, Jaromíra Chýlková, Tomáš Navrátil: *Voltammetric determination of leucovorin in pharmaceutical preparations using a boron-doped diamond electrode*. Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly, in press (2018). IF 1,285

Články v odborných časopisech s IF zaměřené na další pracovní elektrody

1. Michaela Štěpánková, Renáta Šelešovská, Lenka Janíková-Bandžuchová, Jaromíra Chýlková: *Voltametrické stanovení insekticidu imidaclopridu s využitím stříbrné pevné amalgámové elektrody*. Chemické listy 109, 527-534, 2015. IF 0,260

2. Renáta Šelešovská, Lenka Janíková, Michaela Štěpánková, Jaromíra Chýlková: *Copper solid amalgam electrode as a simple and sensitive tool for voltammetric determination of the antineoplastic drug 5-fluorouracil in pharmaceuticals*. Chemical Papers 71, 679-688, 2017. IF 0,963
3. Michaela Štěpánková, Renáta Šelešovská, Lenka Janíková, Jaromíra Chýlková, Ivan Švancara: *Sensitive electrochemical sensor for the determination of folic acid based on a bismuth-film electrode*. Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly 147, 423-433, 2017. IF 1,285
4. Renáta Šelešovská, Pavlína Martinková, Michaela Štěpánková, Tomáš Navrátil, Jaromíra Chýlková: *Comparison Study of Voltammetric Behavior of Muscle Relaxant Dantrolene Sodium on Silver Solid Amalgam and Bismuth Film Electrodes*. Journal of analytical methods in chemistry, 2017, 12 pages, 2017. IF 1,369

Příspěvky ve sbornících z mezinárodních konferencí

1. Michaela Štěpánková, Renáta Šelešovská, Lenka Janíková, Marian Vojs, Marián Marton, Miroslav Behúl, Kateřina Nováková, Jaromíra Chýlková: *Lab-made sensors based on boron-doped diamond for determination of herbicide linuron*. XXXV. Modern Electrochemical Methods (XXXV. Moderní elektrochemické metody), Jetřichovice, Czech republic, 18. – 22.5. 2015, str. 236, ISBN 978-80-905221-3-8.
2. Michaela Štěpánková, Renáta Šelešovská, Lenka Janíková, Jaromíra Chýlková: *Voltammetric behaviour of herbicide linuron on boron-doped diamond electrode*. XV. Workshop of Physical Chemists and Electrochemists (XV. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků), Brno, Czech republic, 26.-27.5. 2015, str. 64, ISBN 978-80-210-7857-4.
3. Renáta Šelešovská, Lenka Janíková-Bandžuchová, Michaela Štěpánková: *Rapid and sensitive Voltammetric analysis of pesticides using silver solid amalgam electrode*. 15th European Meeting on Environmental Chemistry (EMEC 15), Brno, Czech republic, 3.-6.12. 2014, str. 130, ISBN 978-80-214-5073-8.
4. Lenka Janíková, Renáta Šelešovská, Michaela Štěpánková, Jaromíra Chýlková: *Sensitive determination of anti-inflammatory drug sulfasalazine using green*

- electrochemical sensor based on silver solid amalgam*. 6th Meeting on Chemistry and Life, Brno, Czech republic, 2.-4.9. 2015, str. 91.
5. Michaela Štěpánková, Renáta Šelešovská, Lenka Janíková, Jaromíra Chýlková, *Voltammetric behavior of folic acid on bismuth film electrode*, ESEAC MMXVI 16th international conference on electroanalysis, Bath, UK, 12.-16.6. 2016, sborník nestránkovaný, ISBN 978-186-0435-26-3.
 6. Michaela Štěpánková, Renáta Šelešovská, Lenka Janíková, Marian Vojs, Kateřina Nováková, Jaromíra Chýlková. *Characterization of boron-doped diamond electrodes prepared under the different conditions*. Studentská konference Chemie je život, Brno, Czech Republic, 3.-4.12. 2015, str. 91, ISBN 978-80-214-5290-9.
 7. Michaela Štěpánková, Renáta Šelešovská, Lenka Janíková, Jaromíra Chýlková. *Investigation of the electrochemical behavior of mesalazine on a boron-doped diamond electrode*. XXXVI. Moderní elektrochemické metody, Jetřichovice, Czech Republic, 23.-27.5. 2016, str. 247, ISBN 978-80-905221-4-5.
 8. Renáta Šelešovská, Pavlína Martinková, Michaela Štěpánková, *Voltammetric behavior of muscle relaxant dantrolene sodium on silver solid amalgam and bismuth film electrodes*, ESEAC MMXVI 16th international conference on electroanalysis, Bath, UK, 12.-16.6. 2016, sborník nestránkovaný, ISBN 978-186-0435-26-3.
 9. Michaela Štěpánková, Renáta Šelešovská, Lenka Janíková, Marián Marton, Pavol Michniak: *Comparison Study of Voltammetric Determination of Mesalazine Using Boron-doped Diamond Electrodes with Different Content of Boron*. 24. ročník mezinárodní studentské konference YISAC, 28. - 30. 6. 2017, Venice, Italy, str. 32 book of abstracts.
 10. Michaela Štěpánková, Renáta Šelešovská, Lenka Janíková, Marian Marton, Pavol Michniak: *Comparison of Lab-Made Boron Doped Diamond Electrodes in Electroanalysis of Linuron and Mesalazine*. XXXVII. Moderní elektrochemické metody, Jetřichovice, Czech Republic, 15.-19.5. 2017, str. 215-219, ISBN 978-80-905221-5-2.
 11. Renáta Šelešovská, Barbora Kránková, Michaela Štěpánková, Pavlína Martinková, Lenka Janíková, Jaromíra Chýlková, Marián Vojs: *Boron-doped diamond electrodes with different boron content – Determination of leucovorin*. Moderní elektrochemické

metody, Jetřichovice, Czech Republic, 15.-19.5. 2017, str. 201-205, 2017, ISBN 978-80-905221-5-2.

12. Pavlına Martinkov, Renta Őelešovsk, Michaela Őtěpnkov, Jaromıra Chylkov: *Comparison study of voltammetric behavior of muscle relaxant dantrolene sodium on silver amalgam and bismuth film electrodes*. 12th seminar/workshop on Sensing in Electroanalysis, 14. - 17. 11. 2016, Pardubice, Czech Republic.
13. Pavlına Martinkov, Renta Őelešovsk, Barbora Krnkov, Michaela Őtěpnkov, Lenka Janıkov, Jaromıra Chylkov, Marian Vojs: *Voltammetric determination of leucovorin in pharmaceutical samples*, 13th ISC Modern Analytical Chemistry, 21. – 22. 9. 2017, Praha.
14. Renta Őelešovsk, Barbora Krnkov, Michaela Őtěpnkov, Pavlına Martinkov, Lenka Janıkov: *Electrochemical properties of boron-doped diamond electrodes with different boron content*. Mtrafred 2017 – International conference on electrochemical sensors, 11.-16. 6. 2017, Visegrd, Hungary, p. 109.
15. Renta Őelešovsk, Barbora Krnkov, Michaela Őtěpnkov, Pavlına Martinkov, Jaromıra Chylkov: *Voltammetric determination of leucovorin using boron-doped diamond electrodes with different boron content*. Mtrafred 2017 – International conference on electrochemical sensors, 11.-16. 6. 2017, Visegrd, Hungary, p. 110.
16. Renta Őelešovsk, Pavlına Martinkov, Michaela Őtěpnkov, Lenka Janıkov, Jaromıra Chylkov: *Borem dopovane diamantove elektrody v elektroanalze lčiv*. 69. Zjazd Chemikov – International conference, Vysoke Tatry, Horny Smokovec, Slovenska republika. Chem. Zi. 13/1, 73, 2017.

Příloha 2

**Separáty publikací v časopisech s IF související s tématem
disertační práce**