

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Elektrochemie léčiva Diklofenak na uhlíkatých elektrodách a možnosti jeho
monitorování v životním prostředí

Bc. Andrea Bartášková

Diplomová práce

2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Andrea Bartášková**
Osobní číslo: **C16536**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Elektrochemie léčiva *Diklofenak* na uhlíkatých elektrodách a možnosti jeho monitorování v životním prostředí**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. V teoretické části zpracujte formou dílčích literárních rešerší a příslušných textů úvodní téma: "Diklofenak: v roli léčiva i potenciálního polutantu životního prostředí". V další části se pak zaměřte na Diklofenak jako elektrochemicky aktivní látku a shrňte dosavadní poznatky o jeho chování na uhlíkatých elektrodách a možnostech stanovení. Zde pozornost věnujte jak typickým metodám farmaceutické a klinické analýzy, tak i nově navrhovaným postupům monitorování reziduí tohoto léčiva v životním prostředí.
2. V experimentální části nejprve proveďte základní elektrochemickou studii se sledovanou látkou. Ta by měla zahrnovat: (i) použití standardních uhlíkových pastových elektrod (CPE); (ii) definování chování *Diklofenaku* v závislosti na pH a na složení základního elektrolytu; (iii) efekt všech důležitých experimentálních a přístrojových parametrů a (iv) vliv vybraných látek na aktuální odezvu analytu (např. přídavek tenzidu, filmotvorných iontů kovů nebo blokátoru interferencí, Nafionu). Získané výsledky porovnejte s relevantními údaji v literatuře a příslušné relace komentujte.
3. Na základě provedené elektrochemické studie navrhnete a poté i otestujete metodu ke stanovení *Diklofenaku* na velmi nízkých koncentračních úrovních, která by se po důkladném odzkoušení stala základem postupu pro monitorování léčiva ve vzorcích životního prostředí, včetně možností sledovat proces jeho biodegradace.
4. Dosažené výsledky a pozorování diskutujte a kriticky zhodnoťte, přičemž se pokuste nastínit i možné výhledy podobných metod v současné instrumentální analýze.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce:

prof. Ing. Ivan Švancara, Dr.

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce:

doc. Ing. Tomáš Weidlich, Ph.D.

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10.5.2018

Andrea Bartášková

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu diplomové práce, prof. Ing. Ivanu Švancarovi, Dr., za zadání a odborné vedení během jejího zpracování. Dále také konzultantovi doc. Ing. Tomáši Weidlichovi, Ph.D. a Bc. Barboře Kamenické za ochotu a spolupráci při měření.

V neposlední řadě bych chtěla také poděkovat svým rodičům za podporu během celého studia na Univerzitě Pardubice.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá možným stanovením Diklofenaku (DCF, nesteroidní protizánětlivé léčivo) ve vodných vzorcích ze životního prostředí. V první fázi práce byla provedena úvodní elektrochemická studie, při níž se zjistilo, že analyticky využitelná bude anodická oxidace na uhlíkové pastové elektrodě (CPE). Na základě tohoto pak byla navržena jednoduchá voltametrická metoda s pracovní CPE, kdy pro další zvýšení její elektroanalytické výkonnosti byl povrch uhlíkové pasty modifikován kationickým tenzidem typu $R_3R'N^+$ v režimu *in situ*. Po optimalizaci klíčových instrumentálních parametrů byla vypracovaná metoda v závěru ověřována na řadě vzorků modelových a poté i vzorků reálných, získaných z testování možného odstranění nežádoucích reziduí a metabolitů léčiva vybranými fyzikálně-chemickými procesy.

KLÍČOVÁ SLOVA

Diklofenak; uhlíková pastová elektroda; elektrochemické chování; voltametrické stanovení; vzorky životního prostředí.

TITLE

The Electrochemistry of Diclofenac at Carbonaceous Electrodes and Possibilities of Its Monitoring in Environmental Water Samples

ANNOTATION

This diploma thesis deals with a possible determination of Diclofenac (DCF, a non-steroidal anti-inflammatory drug) and its possible determination in water samples from the environment. In the first stage, an initial electrochemical study was performed revealing that analytically useful approach would be the anodic oxidation at a carbon paste electrode (CPE). Based on this, a simple voltammetric method has been proposed, when the performance of the working CPE could further be enhanced by *in-situ* modifying the electrode surface with a cationic surfactant of the $R_3R'N^+$ type. After having optimised the key instrumental parameters, the method elaborated was finally verified on a series of model samples and, subsequently, on real samples that had been obtained from testing on a removal of undesirable residues and metabolites of the drug by selected physicochemical processes.

KEYWORDS

Diclofenac; Carbon paste electrode; Electrochemical behaviour; Voltammetric determination; Environmental samples.

OBSAH

1. ÚVOD	11
2. DIKLOFENAK: PŘEHLED PROBLEMATIKY	13
2.1. Základní charakterizace	13
2.2. Fyzikální a chemické vlastnosti	13
2.3. Existující formy a jejich účinky	14
2.4. Výroba Diklofenaku	14
2.5. Působení v organismu: Metabolismus léčiva	15
3. DIKLOFENAK A ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ	16
3.1. Možnosti odstraňování Diklofenaku z vod	16
3.1.1. Oxidace, pokročilé oxidační procesy	16
3.1.2. Adsorpce na aktivním uhlí	18
3.1.3. Redukce Diklofenaku s využitím kovů	20
3.1.4. Membránová separace	21
3.1.5. Koagulace a flokulace	23
4. DIKLOFENAK: OBJEKT ANALÝZY INSTRUMENTÁLNÍMI TECHNIKAMI	24
4.1. Neelektrochemické metody k identifikaci a stanovení Diklofenaku	24
4.2. Diklofenak: Elektrochemie a elektroanalýza	27
4.2.1. Chování Diklofenaku na uhlíkových elektrodách	27
4.2.2. Přehled metod pro elektroanalytická stanovení DCF	28
4.2.3. Elektrochemické biosenzory	28
4.2.4. Stanovení na elektrodách z modifikovaných uhlíkových past	29
4.2.5. Ostatní elektroanalytické metody pro detekci DCF	30
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
5.1. Chemikálie a roztoky	31
5.2. Pomůcky a přístroje	31
5.3. Příprava roztoků	32
5.4. Příprava uhlíkové pastové elektrody	34

5.5. Zpracování výsledků	34
5.6. Příprava reálných vzorků	34
5.6.1. Sorpce na granulované aktivní uhlí	34
5.6.2. Sorpce na biochar.....	35
5.6.3. Sorpce Diklofenaku na nasycené granulované aktivní uhlí za spolupůsobení kationaktivních tenzidů.....	35
6. VÝSLEDKY A DISKUZE	37
6.1. Základní elektrochemická studie Diklofenaku.....	37
6.1.1. Cyklická voltametrie	37
6.1.2. Vliv pH na odezvu Diklofenaku	38
6.2. Vývoj voltametrické metody ke stanovení Diklofenaku: Optimalizace klíčových experimentálních parametrů.....	40
6.2.1. Měření v lineárním módu	40
6.2.2. Měření v diferenčně pulzním režimu	43
6.2.3. Měření v režimu SWV	47
6.2.4. Porovnání SWV vs. DPV	51
6.2.5. Vliv přídavku tenzidů na odezvu	51
6.2.6. Závislost odezvy na pH za přítomnosti CTAB.....	56
6.2.7. Výběr základního elektrolytu / pufru při optimálním pH	58
6.2.8. Optimalizace koncentrace CTAB pro různé koncentrační úrovně Diklofenaku	59
6.3. Analýza modelových vzorků / roztoků	61
6.3.1. Kalibrační závislosti v SWV módu	61
6.3.2. Mez detekce a mez stanovitelnosti	65
6.3.3. Určení výtěžnosti stanovení	66
6.4. Stanovení Diklofenaku v reálných vzorcích	67
6.4.1. Analýza jednotlivých typů vzorků.....	67
6.4.2. Zhodnocení analýz reálných vzorků	71
7. ZÁVĚR	72
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	73
9. PŘÍLOHY.....	81

Seznam tabulek a obrázků

Obr. 1 – Syntéza Diklofenaku s katalýzou PdI ₂	14
Obr. 2 – Metabolismus Diklofenaku	15
Obr. 3 – Degradace Diklofenaku pomocí ozonu a UV/H ₂ O ₂	17
Obr. 4 – Adsorpce Diklofenaku na OAC	19
Obr. 5 – Chromatografický záznam eluce DCF a jeho metabolitů	24
Obr. 6 – Hmotnostní spektrum Diklofenaku	25
Obr. 7 – Forma Diklofenaku v závislosti na pH	27
Obr. 8 – EC mechanismus pro oxidaci DCF ve vodném prostředí při pH 7	27
Obr. 9 – Příprava a modifikace GCE	29
Obr. 10 – Měřící cela s tříelektrodovým zapojením (foto autorky)	32
Obr. 11 – Reační í schéma izolace Diklofenaku iontovou výměnou	35
Obr. 12 – Cyklický voltamogram při pH = 8.....	37
Obr. 13 – Cyklické voltamogramy při pH 6 až 13.....	38
Obr. 14 – Závislost odezvy proudu pro 500 µM DCF v režimu CV pro pH 6 až 13.....	39
Obr. 15 – Závislost odezvy potenciálu pro 500 µM DCF v režimu CV pro pH 6 až 13.....	39
Obr. 16 – Závislost I _p pro 500 µM na odmocnině rychlosti nárůstu potenciálu	41
Obr. 17 – Závislost E _p na rychlosti nárůstu potenciálu pro 500 µM.....	41
Obr. 18 – Závislost I _p pro 500 µM při různých rychlostech nárůstu potenciálu.....	42
Obr. 19 – Optimalizace amplitudy v režimu DPV pro 50 µM DCF	44
Obr. 20 – Optimalizace rychlosti nárůstu potenciálu v režimu DPV pro 50 µM DCF.	45
Obr. 21 – Kalibrační řada v režimu DPV	46
Obr. 22 – Optimalizace amplitudy v režimu SWV pro 50 µM DCF	47
Obr. 23 – Optimalizace rychlosti nárůstu potenciálu v režimu SWV pro 50 µM DCF.	49
Obr. 24 – Kalibrační řada v režimu SWV.	50
Obr. 25 – Porovnání odezvy DPV vs. SWV pro 50 µM DCF	51
Obr. 26 – Reakční schéma tvorby iontového páru DCF-CTAB.....	52
Obr. 27 – Porovnání odezvy pro 50 µM DCF bez a v přítomnosti CTAB.....	53
Obr. 28 – Porovnání odezvy pro 50 µM DCF bez a v přítomnosti SDS.....	53
Obr. 29 – Porovnání odezvy pro 50 µM DCF bez a v přítomnosti NONIDET.....	54
Obr. 30 – Porovnání odezvy pro 50 µM DCF bez a v přítomnosti PolyDADMAC.....	54
Obr. 31 – Porovnání odezvy pro 50 µM DCF bez a v přítomnosti DBSK.....	55
Obr. 32 – Provnání píků Diklofenaku v přítomnosti CTAB při různých pH.	57
Obr. 33 – Provnání píků různých druhů pufrů při optimálním pH	58
Obr. 34 – Kalibrační řada v koncentračním řádu 0,1 až 1 mM	61
Obr. 35 – Kalibrační řada v koncentračním řádu 10 až 100 µM.	62
Obr. 36 – Kalibrační řada v koncentračním řádu 1 až 10 µM.	63
Obr. 37 – Voltamogramy kalibrační řady 1 až 10 µM	64
Obr. 38 – Vyhodnocení píku pro LOD a LOQ	65
Tabulka 1 – Fyzikálně – chemické vlastnosti Diklofenaku.....	13
Tabulka 2 – Příprava vzorků: Sorpce na GAC I.	34
Tabulka 3 – Příprava vzorků: Sorpce na GAC II.....	35
Tabulka 4 – Příprava vzorků: Sorpce na biochar.....	35
Tabulka 5 – Příprava vzorků: Sorpce na nasycené GAC za spolupůsobení tenzidů	36
Tabulka 6 – CV: Odezva 500 µM DCF při různých pH	38
Tabulka 7 – Kontrola opakovatelnosti pro LSV	42

Tabulka 8 – DPV: Optimalizace amplitudy.....	43
Tabulka 9 – DPV: Optimalizace rychlosti nárůstu potenciálu.	44
Tabulka 10 – Kontrola opakovatelnosti pro DPV.....	45
Tabulka 11 – DPV: Metoda standardního přídávku.....	46
Tabulka 12 – SWV: Optimalizace amplitudy.....	47
Tabulka 13 – SWV: Optimalizace rychlosti nárůstu potenciálu.....	48
Tabulka 14 – SWV: Kontrola opakovatelnosti.....	49
Tabulka 15 – SWV: Metoda standardního přídávku.....	50
Tabulka 16 – LSV: Vliv pH na odezvu za přítomnosti CTAB pro 500 μM DCF	56
Tabulka 17 – LSV: Vliv pH na odezvu za přítomnosti CTAB pro 50 μM DCF	56
Tabulka 18 – LSV: Vliv pH na odezvu za přítomnosti CTAB pro 10 μM DCF	57
Tabulka 19 – Odezvy pro různé typy pufrů v přítomnosti CTAB pro 10 μM DCF	58
Tabulka 20 – LSV: Odezvy různých koncentrací DCF pro 50 μM CTAB	59
Tabulka 21 – LSV: Odezvy různých koncentrací DCF pro 5 μM CTAB	59
Tabulka 22 – LSV: Odezvy různých koncentrací DCF pro 0,5 μM CTAB	59
Tabulka 23 – SWV: Odezvy různých koncentrací DCF pro 50 μM CTAB.....	60
Tabulka 24 – SWV: Odezvy různých koncentrací DCF pro 5 μM CTAB.....	60
Tabulka 25 – SWV: Odezvy různých koncentrací DCF pro 0,5 μM CTAB.....	60
Tabulka 26 – SWV: Kalibrační řada I.....	61
Tabulka 27 – SWV: Kalibrační řada II.....	62
Tabulka 28 – SWV: Kalibrační řada III.	63
Tabulka 29 – Mez detekce a stanovitelnosti.....	65
Tabulka 30 – Určení výtěžnosti stanovení pro 5 různých koncentrací Diklofenaku	66
Tabulka 31 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 63BK1	67
Tabulka 32 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 63BK2.....	67
Tabulka 33 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 63BK3.....	67
Tabulka 34 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 223BK1	67
Tabulka 35 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 223BK2.....	67
Tabulka 36 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 223BK3.....	68
Tabulka 37 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 223BK4.....	68
Tabulka 38 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 2903BK1	68
Tabulka 39 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 2603BK1	68
Tabulka 40 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 44BK1	68
Tabulka 41 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 44BK2.....	68
Tabulka 42 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 44BK3.....	69
Tabulka 43 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 44BK4.....	69
Tabulka 44 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 104BK1	69
Tabulka 45 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 104BK2.....	69
Tabulka 46 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 104BK3.....	69
Tabulka 47 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 104BK4.....	69
Tabulka 48 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 104BK5.....	70
Tabulka 49 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 1104BK.....	70
Tabulka 50 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 1104BK6.....	70
Tabulka 51 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 1204BK1	70
Tabulka 52 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 1204BK2.....	70
Tabulka 53 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 1204BK3.....	70
Tabulka 54 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 1204BK4.....	71
Tabulka 55 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 1204BK5.....	71

1. Úvod

Elektrochemická a elektroanalytická měření s uhlíkovými pastovými elektrodami (CPE) mají na Katedře analytické chemie Univerzity Pardubice (UPa) dlouhou tradici. Právě loni tomu bylo přesně třicet let, kdy spatřilo světlo světa první písemné sdělení na toto téma [1]. Jakýmsi formálním završením vědecko-výzkumných aktivit elektroanalytické skupiny na Univerzitě Pardubice byl zásadní podíl na sepsání a vydání monografie u prestižního nakladatelství [2], detailním ohlédnutím pak loni uveřejněný referát, který byl věnován právě zmíněnému jubileu [3] a přinesl vůbec poprvé kompletní přehled prací na téma CPE, na nichž se nějakým způsobem pardubičtí elektroanalytici podíleli.

Na konci druhé dekády nového milénia je práce s CPE charakterizována dvěma hlavními směry. Prvním z nich je využívání předchozích zkušeností s tradičními uhlíkovými pastami v práci s novými konfiguracemi na bázi tištěných uhlíkových inkoustů. Tyto planárně konstruované senzory nebo i více-elektrodové cely malých rozměrů jsou pak testovány pro cílená použití v analytické praxi, poslední dobou především v klinické analýze významných biologicky aktivních sloučenin. Druhým směrování jsou rovněž prakticky orientovaná měření, tentokrát s nejrůznějšími typy uhlíkových past, včetně osvědčených tradičních směsí, a spadající do oblasti analýzy potravin a vybraných farmaceutických preparátů, příležitostně i pro potřeby monitorování kvality / znečištění životního prostředí. Analýzu potravinářských vzorků reprezentovaly např. metody ke stanovení úhrnného množství jedlých olejů, kapsaicinu a myristicinu, spíše farmaceuticky byly orientovány postupy navržené ke stanovení nikotinu, kofeinu a synefrinu, tj. látek ze skupiny přírodních alkaloidů.

Jakousi kombinací farmaceutické a klinické analýzy se zaměřením na environmentální problematiku je téma této diplomové práce. Ústředním tématem je celosvětově rozšířené léčivo Diklofenak (popř. také Diclofenac) a vývoj jednoduché metody jeho stanovení ve vzorcích vod. Nejnovější výzkumy ukazují, že komerčně propagované a masově užívané medikamenty jako Diklofenak, začínají být problémem pro kvalitu přírodních vod, neboť přítomná rezidua takových léčiv či jejich metabolitů ohrožují vodní organismy a nepřímo i člověka. Proto se monitorování těchto znečištění stává jedním z intenzivně sledovaných a na nejrůznějších fórech diskutovaných problémů současné environmentální analýzy (viz např. referát [4] a citace v něm uvedené).

Že jde o problematiku velmi aktuální a důležitou, dokládá i článek, který byl zveřejněn v době zpracovávání této diplomové práce – vyšel v internetovém deníku *i-Dnes*, a to mezi hlavními zprávami (viz [5] a Příloha I).

A právě Diklofenak byl v této reportáži diskutován jako názorný příklad dopadu masového používání některých medikamentů na životní prostředí, v tomto případě na kvalitu přírodních vod. Předložená diplomová práce shrnuje výsledky a pozorování z úvodní studie, přičemž se předpokládá, že zvolenému tématu bude elektroanalytická skupina — nadále v úzké spolupráci s Ústavem environmentálního a chemického inženýrství na UPa — věnovat pozornost i v příštích letech.

2. Diklofenak: Přehled problematiky

2.1. Základní charakterizace

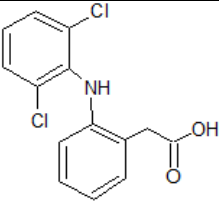
Diklofenak (DCF; také Diclofenac, z angl. *Diclofenac*), jehož název je odvozen od jeho chemického názvu: 2- (2,6- dichloranilino)fenyloctová kyselina; byl objeven švýcarskou farmaceutickou společností v roce 1973. Je to velmi účinné analgetikum- antiflogistikum, běžně se užívá ke snížení zánětlivých a degenerativních onemocnění páteře, kloubů (přednostně se hromadí v kloubní tekutině), po úrazech a operacích, při silných bolestech hlavy a menstruačních bolestech.

DCF je často uznáván jako "světový nejoblíbenějšího lék proti bolesti "a je také řazen mezi nejčastěji užívaná nesteroidní antiflogistika (NSAID, z angl. *Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs*) spolu s Ibuprofenem, Naproxenem a Mefenamovou kyselinou. Na základě údajů o zdravotní péči *Intercontinental Marketing Services* (IMS), se uvádí, že je ročně spotřebováno asi 940 tun DCF, avšak skutečná spotřeba bude ještě vyšší, jelikož tento údaj nepokrývá veterinární spotřebu, pro kterou nejsou dostupná data [6, 7].

2.2. Fyzikální a chemické vlastnosti

Diklofenak se využívá jako sodná nebo draselná sůl, a to především pro zlepšení rozpustnosti; je rozpustný v acetonu, ethanolu a prakticky nerozpustný v etheru [7].

Tabulka 1 – Fyzikálně – chemické vlastnosti Diklofenaku [7]

Vlastnost	
Struktura	
Sumární vzorec	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$
Molekulová hmotnost	296,16 g. mol ⁻¹
Rozpustnost ve vodě	2,37 mg. L ⁻¹ (25 °C)
Bod tání	283–285 °C (při 760 mm Hg)
Bod varu	412 °C (při 760 mm Hg)
pKa	4,15
Log Kow (rozdělovací koeficient oktanol-voda)	4,51

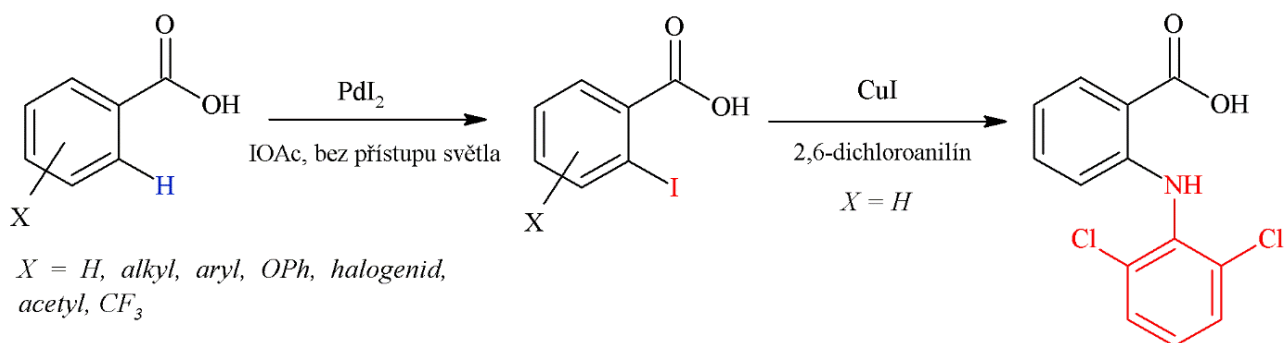
2.3. Existující formy a jejich účinky

DCF v komerčních preparátech je obvykle dostupný v podobě gelu (např. VOLTAREN®) nebo může být podáván orálně formou potahovaných tablet (např. APO-DICLO, DICLOREUM).

Mezi nežádoucí vedlejší účinky patří především nevolnost a zvracení, mohou se objevit závratě, únava, podrážděnost, při dlouhodobých užívání se zvyšuje riziko krvácení ze zažívacího traktu. Dlouhodobé užívání Diklofenaku také zvyšuje riziko infarktu myokardu a cévní mozkové příhody. Ze statistik vychází, že užívání 150 mg účinné látky denně po dobu jednoho roku vede u 0,3 % uživatelů ke vzniku infarktu, který by je bez dlouhodobého užívání DCF nepostihl [7, 8].

2.4. Výroba Diklofenaku

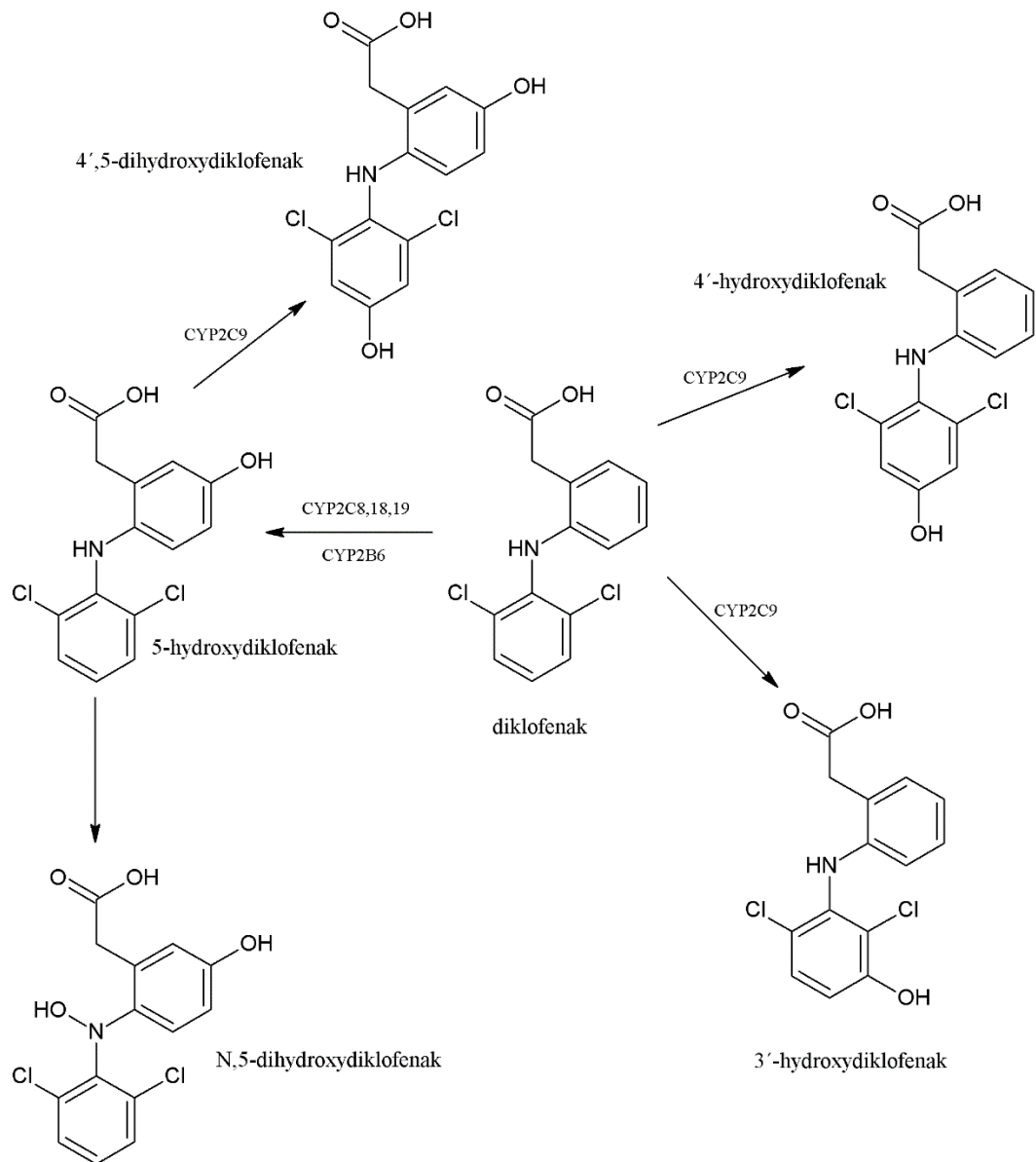
Diklofenak je vyráběn organickou syntézou různými způsoby. Nejčastěji je získáván acylací *N*-fenyl-2,6-dichloranilinu, který se posléze oxiduje s *m*-chlorperoxibenzoovou kyselinou nebo peroxidem vodíku. Tyto poměrně náročné syntézy je možné i zjednodušovat, např. s využitím PdI₂ jako katalyzátoru k jodaci kyseliny fenylacetové do polohy *ortho*- a pak následné syntéze DCF [9, 10].



Obr. 1 – Syntéza Diklofenaku s katalýzou PdI₂

2.5. Působení v organismu: Metabolismus léčiva

Účinnost nesteroidních antirevmatik je založena na principu blokády speciálních enzymů, zodpovědných za produkci látek vznikajících v organismu, které vyvolávají záněty, zvýšenou tělesnou teplotu a horečku až bolest. Tyto enzymy jsou tzv. cyklooxygenázy I, II a III (COX I, COX II, COX III). Typ COX II je právě zodpovědný za vznik zánětu a bolesti [11, 12].



Obr. 2 - Metabolismus Diklofenaku [12]

3. Diklofenak a životní prostředí

Diklofenak jako převládající protizánětlivé léčivo je využíván po celém světě. Ruku v ruce s užíváním léku vzrůstá význam jeho následného výskytu v různých oblastech životního prostředí, především jeho výskyt ve vodách, a proto se věnuje pozornost jeho potenciální toxicitě vůči organismům (ryby, slávky, vodní mikroorganismy) [13].

30 až 70 % DCF je odstraněno konvenčním způsobem v čistírnách odpadních vod (ČOV) a zbytek projde neupravený do povrchové vody (viz Příloha II.). DCF a jeho metabolity můžou také interagovat s jinými kontaminujícími látkami, ať už anorganickými – kovy, tak i organickými a jejich toxicita se může zvyšovat [6].

Zdrojem Diklofenaku je farmaceutický průmysl, kde je produkován jak pro humánní, tak i veterinární účely. Prostřednictvím lidských i veterinárních cest skončí DCF s odpadními vodami na ČOV nebo na skládkách, ať už jako nezměněný DCF nebo jako jedna z forem jeho metabolitu. Také existuje jistá pravděpodobnost, že se léčivo dostává do čistírny odpadních vod přímo z farmaceutických průmyslových zbytků. Účinnost ČOV, která není zdaleka dostačující, dává pak další možnost průniku DCF do zdrojů pitné vody, nicméně větší riziko pravděpodobnosti průsaku DCF je ze skládek (především v asijských zemích, jako např. Nepál, Čína) [14].

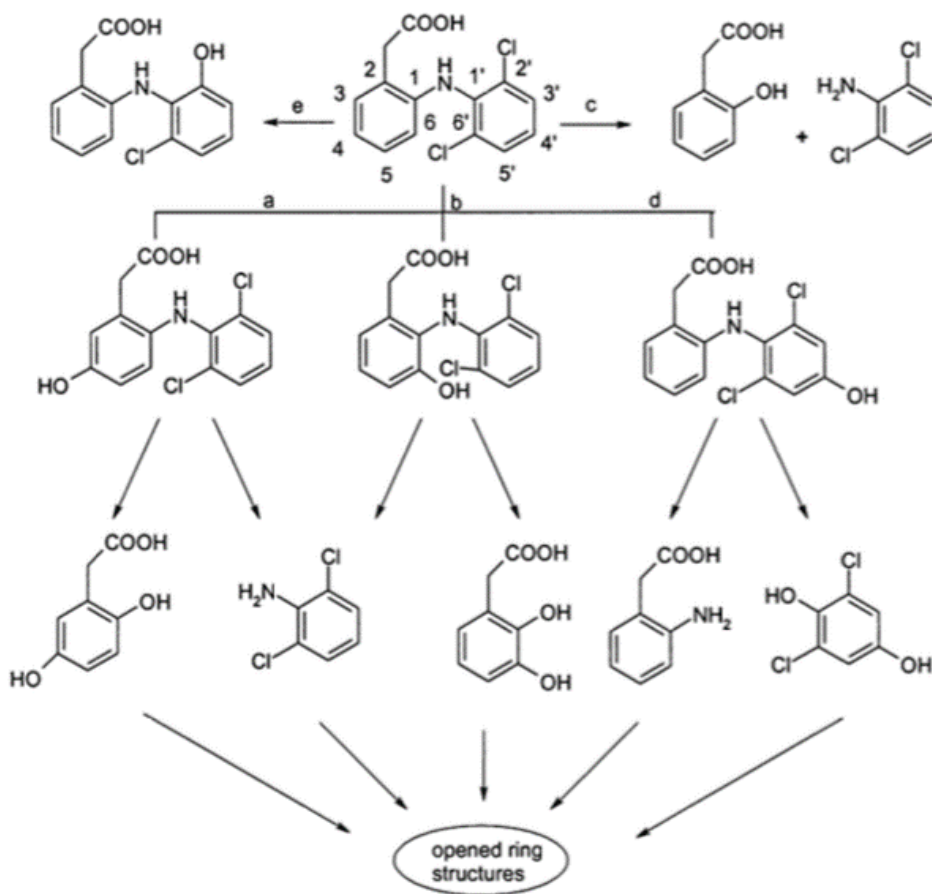
3.1. Možnosti odstraňování Diklofenaku z vod

3.1.1. Oxidace, pokročilé oxidační procesy

Nejvýznamnější využití mezi technologiemi, které se zabývají odstraňováním Diklofenaku z průmyslových a pitných vod, jsou pokročilé oxidační procesy (AOP, z angl. *Advanced Oxidation Process*). Jsou široce vyvíjeny a používají se při odstraňování nebiodegradovatelných sloučenin, což umožňuje dobré odstranění znečišťujících látek a konečnou mineralizaci vytvořených vedlejších produktů [15, 16].

Perspektivní je i možnost odstranění Diklofenaku pomocí ozonu či UV/H₂O₂. Tyto dva široce používané oxidační systémy mívají ve většině případů vysokou účinnost a mají vysokou úroveň technického vývoje pro průmyslové použití. Lze dosáhnout úplné konverze na chloridové ionty (Cl⁻ vznikají při oxidaci) a 32% stupně mineralizace pomocí ozonizace a 39 % mineralizaci pomocí UV/H₂O₂ po reakční době 90 minut. Také bylo zjištěno, že obě reakce probíhají podobně, ale ne identicky. Reakční cesty vedou přes složité meziprodukty (např. kyselina 2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]-5-hydroxyfenyloctová).

Úplnou oxidací Diklofenaku dochází ke vzniku produktů se strukturou otevřeného aromatického kruhu (viz obr. 3) [15].



Obr. 3 - Degradace Diklofenaku pomocí ozonu a UV/H₂O₂ [15]

Z důvodu nepříliš účinné metody odstraňování Diklofenaku samotným ozonem byla testována další metoda kombinující ozonizaci s adsorpcí aktivního uhlí. Při 120 minutách reakčního času bylo dosaženo pouze 40 % odstranění léčiva pomocí samotného ozonu, avšak s malým přídavkem aktivního uhlí tato účinnost vzrostla až na 95 %. Silně však závisí na experimentálních podmínkách a reakční době [16].

Ve studii Macsek T. a kol [17] se pak snažili porovnat jednotlivé AOP v průtočném reaktoru. Výsledky ukazují, že dostatečná míra odstranění Diklofenaku a dalších polutantů (ibuprofen, naproxen atd...) byla dosažena pouze použitím procesů založených na ozonizaci. Procesy oxidace peroxidem vodíku nedosáhly ani při 24násobném zvýšení dávky H₂O₂ oproti O₃ srovnatelných výsledků. Z testovaných kombinací oxidačních procesů byla kombinace H₂O₂/O₃ nejúčinnější, protože bylo dosaženo téměř 90 % účinnosti odstranění všech polutantů.

Hojně využívaná technika odstraňování Diklofenaku pomocí typu Fentonovy reakce tzv. fotofentonu (Fentonova reakce kombinovaná s UV-A). Testován byl vliv koncentrace Fe^{3+} , přítomnost záření UV-A a H_2O_2 , a to jak v kyselém, tak v neutrálním pH.

V závislosti na provozních podmínkách bylo dosaženo efektivity odstraňování Diklofenaku okolo 70 %, přičemž nejlepší výsledky byly při neutrálním pH a přítomnost UV-A záření [18]. Vedle Fentonovy reakce byla testována i možnost oxidace katalyzované pyritem [19].

Jako speciální techniky oxidace byla také představena možnost elektrooxidace Diklofenaku v přítomnosti boru, kdy při potenciálech 4,0 V bylo zmineralizováno až 72 %. Dále pak byl studován vliv přídavku NaCl do tohoto systému. Zjistilo se, že při přídavku chloridu sodného s borem dochází ke vzniku několika dechloračních meziproductů (např. dichlordiklofenak), které vedly ke zvýšení celkového organického uhlíku (TOC) v porovnání s elektrolýzou bez přídavku NaCl. Všechny meziproducty oxidace však s delším reakčním časem vymizely a dále byly detekovány pouze malé organické molekuly [20]. Dalším příkladem speciální degradace Diklofenaku je zrychlení jeho oxidace pomocí reakce Fe^{VI} s 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonátem (ABTS). Reakce šestmocného železa s ABTS produkuje radikál $\text{ABTS}^{\bullet+}$, který při interakci Diklofenaku v přítomnosti dalšího železa urychluje oxidaci. Tímto postupem může být dosaženo až 90 % účinnosti odstranění Diklofenaku [21].

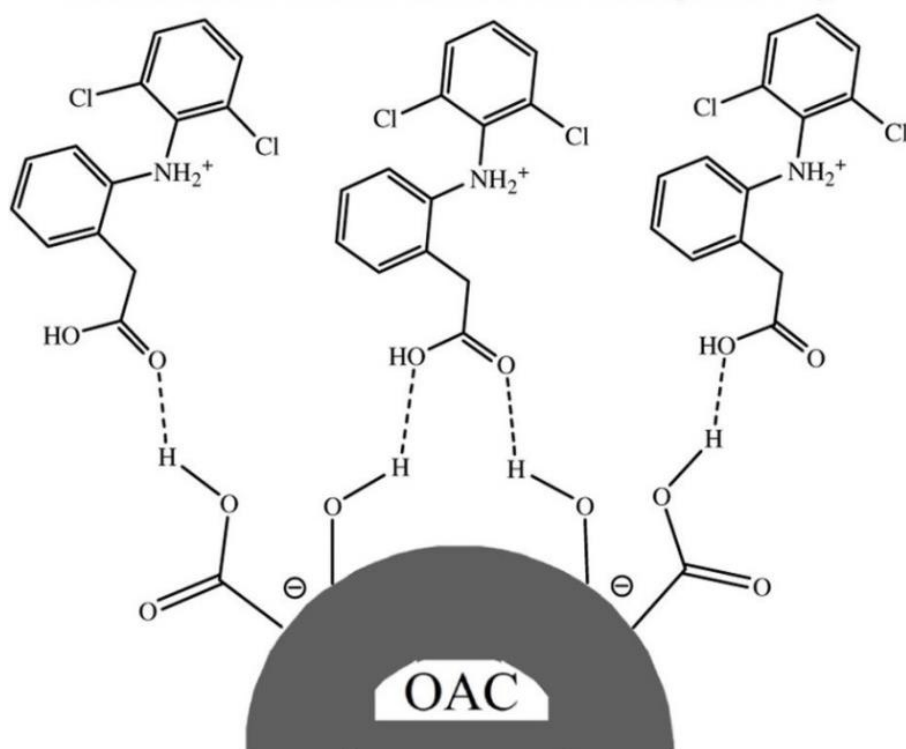
3.1.2. Adsorpce na aktivním uhlí

Další velmi využívanou technologií je odstraňování DCF adsorpcí na různé typy aktivního uhlí. Klasické aktivní uhlí (AC) bez modifikací se pro svoji nedostatečnou účinnost již prakticky nevyužívá, ale přechází se k typům, jako granulovaný aktivní uhlík (GAC) či oxidované aktivní uhlí (OAC).

Konkrétní příklad využití GAC popisuje Chang a kol. [22] nebo skupina kolem Sotela a Rodríguezze [23]. Sledují především vhodné podmínky saturace a průběhy adsorpčních křivek či efekt makropórů, jež mají významný vliv na adsorpci u vícesložkových systémů. Sotelo a Rodríguez zjistili, že pro DCF je dosaženo adsorpční rovnováhy až po 14 dnech, a samostatné využívání granulovaného uhlí se tudíž zdá být neúčinné.

Možností, jak zvýšit účinnost adsorpce je kombinace různých aktivních uhlí s procesem ozonizace, která degradaci DCF zkracuje na méně než 15 minut, a hlavně snižuje toxicitu kontaminované vody. Mezi nejvhodnější typy aktivního uhlí se řadí například Hydrarffin P110 [24].

Pro adsorpci DCF z vodných roztoků jsou vhodná také povrchově modifikovaná uhlí, resp. oxidované aktivní uhlí (OAC), které v porovnání s obyčejným AC dosahuje až 6krát větší účinnosti. OAC může být navíc recyklováno jednoduchým promývacím rozpouštědlem - dá se tedy říci, že OAC jsou slibným adsorbentem pro komerční odstraňování DCF z kontaminovaných vod [25].

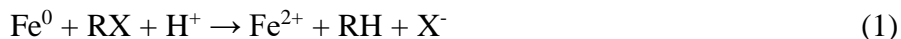


Obr. 4 – Adsorpce Diklofenaku na OAC [25]

Velmi ekologickým přístupem je využívání zbytkových/odpadních materiálů, které se strategicky mění na tzv. biochar, což je dřevěné uhlí vyráběné z biomasy. To může být vyráběno z rozličných materiálů, jako např. borovicové dřevo či prasečí hnůj. Této problematice se věnuje především Lonappan se svou skupinou a ve svých pracích popisuje široké využití i pro adsorpci Diklofenaku [26].

3.1.3. Redukce Diklofenaku s využitím kovů

Jako další možností odstranění Diklofenaku z vodného prostředí je jeho redukce - například elementárním kovem, kterým může být elementární železo. Ve vodném prostředí dochází k redukci halogenovaných látek dle rovnice 1 [27].



Částice elementárního železa jsou vhodné pro odstranění řady organických i anorganických sloučenin. V mnoha pracích, které byly věnovány dehalogenacím organických halogen-derivátů, je často využívána kombinace více kovů. Depozice elektropozitivnějšího kovového prvku (Pd, Cu, Ni) na povrchu částic železa (popř. elementárního hliníku) vede ke zvýšení rychlosti koroze a k tvorbě galvanického článku. Vodík adsorbovaný na povrchu příslušného povlaku je zodpovědný za primární mechanismus dehalogenačních reakcí [28, 29]. Ve studii Ghaush A. a kol k odstraňování Diklofenaku využívali redukci bimetalickým systémem – využívali železo v kombinaci s druhým kovem (Co, Cu, Ir, Ni, Pd a Sn) za oxických i anoxických podmínek. Za anoxických podmínek bylo zdaleka nejúčinnějším druhým prvkem Pd, po němž v účinnosti následovaly Ir, Ni, Cu, Co a Sn. Za oxických podmínek pak Pd a Cu vykazovaly téměř stejnou účinnost při odstraňování Diklofenaku [28]. Následně v další studii Ghaush A. a kol testovali využití trimetalického systému kovů: kombinaci železa s Pd, Cu a Ni. Jako nejúčinnější se pak jeví využití kovů Cu, Pd a Fe v anoxických podmínkách. Tento systém funguje tak, že velice rychle generuje H₂ a dochází k efektivnímu odstraňování Diklofenaku z vod [29].

Další možností odstraňování Diklofenaku z vod pomocí kovů je využití systému hliník–kyselina. V tomto případě není třeba do reakce přidávat peroxid vodíku jako v případě AOPs, protože v přítomnosti vzdušného kyslíku dochází k jeho vzniku. Uvedeným postupem by mělo docházet k produkci HO• radikálů, pomocí kterých dochází k oxidační degradaci. Bylo však dokázáno, že v případě využití Al/kyselina je prvním procesem degradace Diklofenaku redukční dehalogenace. Tento proces je vysoce efektivní, jelikož Fentonova reakce nedosahuje takové účinnosti a redukce elementárním železem nedosahuje redukční síly kovového hliníku [30].

3.1.4. Membránová separace

Další možností odstraňování Diklofenaku z vod je využití membrán(y). Mezi výhody využití membránové separace kontaminantů z vod lze zařadit: (i) velmi vysoká účinnost čištění, (ii) zařízení jednoduché na provoz a údržbu, (iii) nízká energetická náročnost, (iv) kontinuální děj, (v) nízké investiční náklady a (vi) možnost pracovat bez přídavku dalších reagensů. Nevýhodami těchto procesů naopak je: (i) zanášení membrán, (ii) nízká selektivita nebo výkon a (iii) nízká životnost membrán. Mezi membránové separace lze zařadit mikrofiltraci, ultrafiltraci, nanofiltraci a reverzní osmózu nebo speciální technologie jako membránové bioreaktory (kombinovaný proces bioreakce a membránové separace v jednom celku, obvykle tvořený ponorným membránovým modulem v bioreaktoru) apod. [31, 32].

Ve srovnání s konvenčním biologickým odbourávání kontaminantů (CAS) z vod mohou být membránové bioreaktory (MBR) účinnější, protože v MBR se obvykle používají vyšší časy retence kalu. Nicméně i když vysoký čas retence obvykle zvyšuje degradaci sloučenin s nízkou biologickou odbouratelností ukázalo se, že efektivní odstranění všech mikropolutantů není dosaženo samotným procesem MBR. Použití postupu reverzní osmózy (RO) jako následné techniky po MBR nebo CAS může dosáhnout vyšších účinností odstraňování mikropolutantů. Také bylo dokázáno, že použití nanofiltračních membrán může mít za následek vysokou míru odstranění některých mikroprvků. Při využití MBR s následnou RO lze dosáhnout přes 84 % účinnosti odstranění Diklofenaku a dalších kontaminantů [31]. K odstraňování Diklofenaku vedle Bisfenolu A z vod v nesterilním prostředí outkovky pestré (parazitická houba z čeledi Chorošovitě) pomocí MBR bez dalších doprovodných technik lze pak dosáhnout pouze 55 % účinnosti odstranění Diklofenaku [32].

Často jsou s membránovými separacemi kombinovány další technologické procesy, např. adsorpce, AOPs či ultrazvukové ozařování, čímž dochází k vysoce efektivní produkci vod zbavených kontaminantů; tyto procesy lze nazývat hybridními. Pro odstraňování Diklofenaku lze např. využít kombinace adsorpce, nanofiltrace a ultrazvukového ozařování. Membránová filtrace (Me) a adsorpce (A) jsou mezi dvěma nejčastěji používanými procesy předúpravy vod. Ultrazvukové ozařování (US), kromě jeho destruktivního působení na látky prostřednictvím ultrazvuku, je také dobrou pomocnou metodou, která zvyšuje účinnost membránové filtrace a adsorpčních procesů. Takové hybridní procesy přináší mnoho výhod. Nedávné výzkumy o současném použití těchto tří metod v hybridním procesu s názvem USAMe®, tj. kombinace *Membrane Filtration* (ME), *Adsorption* (A) a *Ultrasound Irradiation* (US), vedlo k velmi důkladnému odstranění farmaceutik z odpadních vod,

obsahující i Diklofenak (cca 100 ppm). Stupeň odstranění léčiva Diklofenaku byl dosažen v tomto pořadí: Me <USMe <AMe <USAMe®. Proces USAMe® aplikovaný na reálných vzorcích úspěšně odstranil cílová léčiva a ukázal svůj potenciál jako pokročilý způsob čištění odpadních vod [32].

Dalším příkladem hybridního procesu je proces *in situ* využívající adsorpci na aktivní uhlí, AOPs a ultrafiltraci. Tento proces zároveň kombinuje regeneraci práškového aktivního uhlí (PAC). Jako adsorbenty lze použít komerční PAC a speciální PAC impregnované železem (PAC-Fe). Jako lepší sorbent se jeví PAC-Fe jelikož při následném přidávku peroxidu vodíku produkuje heterogenní reakce podobné Fentonovým reakcím. Katalytický adsorbent (PAC-Fe) si zachová svou stabilitu a aktivitu po třech pracovních cyklech, což výrazně snižuje provozní náklady. Pro regeneraci PAC lze použít dávku samotného H₂O₂ nebo v kombinaci s UV-C zářením. Jako konečná technika je pak zařazena ultrafiltrace odstraňující zbytky Diklofenaku [33].

Ultrafiltrační (UF) membrána je charakterizována poměrně velkými póry, což umožňuje použití nižšího rozdílu tlaků. Zachycování nízkomolekulárních organických kontaminantů, jako je DCF, pomocí UF membrán je však poměrně nízké. Aby se zlepšila účinnost odstraňování, může být velikost kontaminantu s nízkou molekulovou hmotností zvýšena jeho vazbou na větší entitu; tento přístup tvoří základ micelární ultrafiltrace (MEUF). Ve skutečnosti se ukázalo, že MEUF je účinnou technikou odstraňování různých stopových kontaminantů v odpadních vodách, včetně barviv a fenolů. Tato technika je založena na aplikaci tenzidů, které jsou ve vodě schopny spontánně agregovat za vzniku micel. Vnitřní jádro micely je hydrofobní a může tak rozpouštět hydrofobní a méně polární molekuly. Vnější polární nebo nabitá vrstva micely pak interaguje s opačně nabitými ionty a molekulami se silnými dipóly. Micely mají větší velikost než póry UF membrány, a proto je lze snadno zachytit společně s navázanými kontaminanty. S použitím MEUF lze tedy získat vysoce čistý produkt – permeát. [34].

3.1.5. Koagulace a flokulace

Dalšími postupy, které lze využít k odstraňování Diklofenaku z vod, mohou být koagulace a flokulace, i přesto, že nebyly tyto techniky častým předmětem výzkumu snižování množství farmaceutik ve vodách.

Procesy koagulace a flokulace zvyšují vylučování suspendovaných pevných látek a koloidů, protože přidání kovových solí nebo organických sloučenin způsobuje aglomeraci těchto částic, což umožňuje jejich eliminaci dekantací nebo filtrací. Práce zaměřené na odstraňování léčiv způsobu koagulace a flokulace jsou vzácné a samostatné využití těchto procesů je pro léčiva velmi málo účinné. Velmi často se kombinují s dalšími technikami jako je adsorpce, biologické odbourávání, filtrace, flotace a atd. Léčiva včetně Diklofenaku lze odstranit kombinací koagulace a flokulace asi ze 70 %. Jako koagulační činidlo lze využít chlorid či síran železitý a jako flokulant pak polymery. Byl také testován nový typ vysoce účinného polymerního koagulantu polychloridu hliníku. Účinnost těchto metod také závisí na teplotě, která by se měla pohybovat v rozmezí 12-25 °C [35, 36].

Také byly testovány metody kombinující koagulaci a přítomnost rozpuštěných organických látek, zejména pak huminových látek ve vodách. Ve studiích zkoumající koagulaci vod s obsahem směsi léčiv bylo zjištěno, že pomocí síranu železitého lze odstranit DCF až z 66 %, v přítomnosti huminových látek lze pak dosáhnout až 77 % účinnosti odstranění DCF, a cca 50 % účinnosti odstranění léčiv ostatních. Bylo rovněž zjištěno, že vysoké množství vysokomolekulárních rozpuštěných organických látek ve vodách výrazně zlepšuje odstranění léčiv, přičemž výtěžnost výrazně závisí na hodnotě pH, která by se měla pohybovat v kyselé oblasti. Přesto lze konstatovat, že koagulací nelze snížit množství Diklofenaku a obecně i ostatních léčiv na minimum, avšak tento chemický postup působí selektivně alespoň na Diklofenak [35].

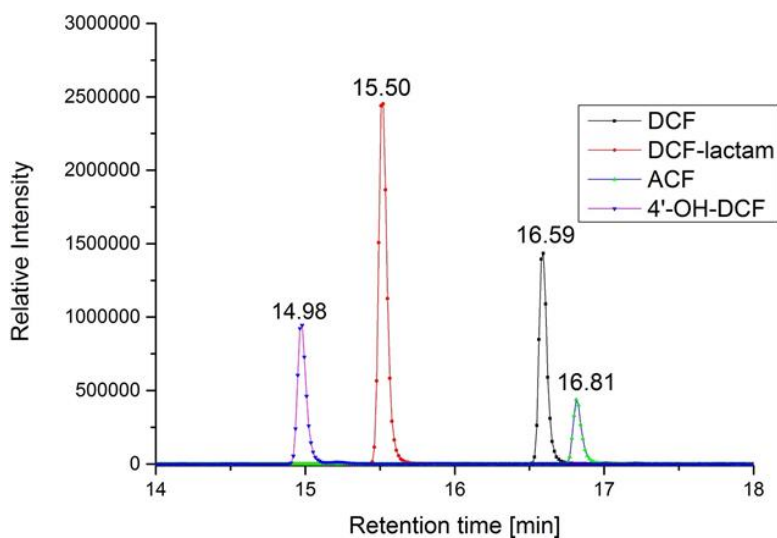
4. Diklofenak: Objekt analýzy instrumentálními technikami

4.1. Neelektrochemické metody k identifikaci a stanovení Diklofenaku

Vzhledem k vysoké poptávce Diklofenaku ve farmaceutickém průmyslu bylo navrženo také velké množství analytických metod pro jeho kvantifikaci. Obvykle se jedná o vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), plynovou chromatografii (GC), zónovou kapilární elektroforézu (CZE), spektrofotometrii, včetně příbuzné spektrofluorometrie. Všechna tato měření mají však i některé nevýhody jako je často zdlouhavá úprava vzorku (extrakce nebo i chemická derivatizace), časově náročná analýza, a v neposlední řadě i vysoké náklady na analýzu.

Nejrozšířenější instrumentální technikou ke stanovení Diklofenaku je bezesporu kapalinová chromatografie (LC), resp. její různé modifikace, především HPLC. Jedna z možných metod, kterou autoři označují jako rychlou a citlivou, se zabývá stanovením Diklofenaku v synoviální tekutině (tj. v kloubní tekutině) v níž se přednostně akumuluje. Zvláštní pozornost je především věnována postupu přípravy vzorku, jelikož se může v synoviálních vzorcích objevovat nežádoucí gelová forma. S využitím jednostupňové extrakce byla následná HPLC analýza upravena tak, aby byla dosažena adekvátní citlivost a přesnost potřebná pro analýzu reálných vzorků a metodu bylo možné využít v praxi [37].

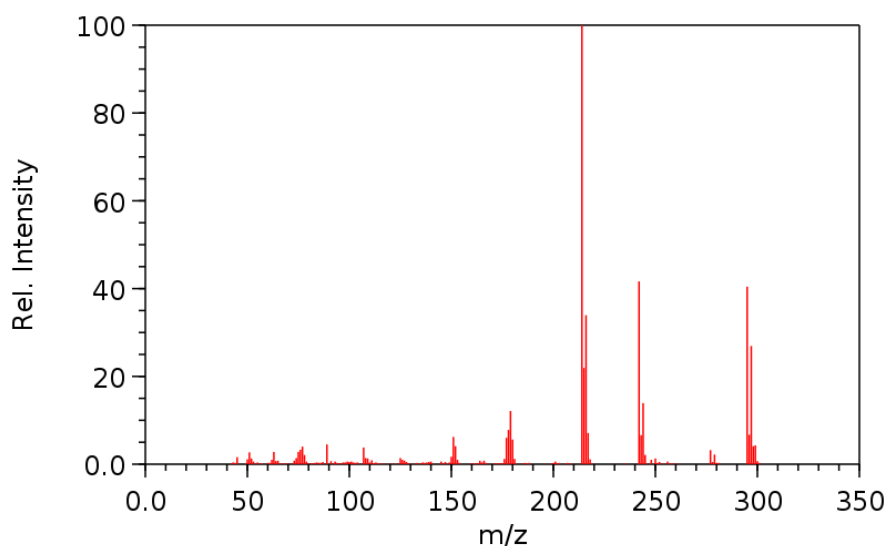
Často používané je spojení HPLC-MS, které spolehlivě identifikuje i různé metabolity Diklofenaku, jako je např. 4'-hydroxy-Diklofenak (4'-OH-DCF) či laktam Diklofenaku. Příslušné meze detekce se pohybují při 3 g/L, resp. 0,17 g/L [38].



Obr. 5 - Chromatografický záznam eluce DCF a jeho metabolitů [38]

Pro stanovení DCF v čisté formě i v matrici byla také mimo jiné představena ultraúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) s obrácenými fázemi a UV detekcí při 254 nm, kde pík DCF měl retenční čas 0,94 min. Léčivo bylo podrobena kyselým i alkalickým mediím, oxidačním činidlům i varu, aby se navodil stav tzv. stresových podmínek a došlo k degradaci. Tato nová metoda dokázala oddělit degradační produkt a může tak být využívána jak k monitorování samotného léčiva, tak jeho čistoty a uvolňování z různých přípravků bez přidaného excipientu. Mez detekce je uváděna 2 ppm; mez stanovitelnosti 6 ppm [39].

Zajímavou je studie, věnující se odstranění Diklofenaku ze vzorků vody pomocí UV záření s využitím kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). Ozáření vodného roztoku světlem v rozsahu vlnových délek 220 až 500 nm poskytuje rychlou degradaci Diklofenaku; takto bylo pak detekováno pomocí LC-MS s obrácenými fázemi 11 transformačních produktů. Doprovodné fragmentace umožnily jejich charakterizaci a vedly k navrhovaným strukturám pro většinu z nich, některé struktury totiž mohou vysvětlit zvýšenou toxicitu, která byla pozorována po ozáření roztoku Diklofenaku [40].



Obr. 6 – Hmotnostní spektrum Diklofenaku [41]

Výjimkou není ani využití plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS), např. při kvantifikaci DCF ve farmaceutických přípravcích s mezí stanovitelnosti (LOQ) 0,15 µg/ml. Navržená metoda byla vhodná pro kontrolu obsahu látky v přípravcích a zjištění uniformity [42].

Velmi aktuální záležitostí je i využívání různých organických komponentů jako jsou například jíly, a to není výjimkou ani při detekci DCF. Využití těchto organických jílu se dvěma kationtovými povrchově aktivními látkami popisuje studie věnující se pochopení adsorpčního mechanismu těchto jílu a Diklofenaku při různých pH a teplotách.

Experimentální data získaná sérií komplementárních technik (rentgenová difrakce, elementární analýzy, GC/MS a FT-IR) ukázaly, že organické jíly je možno využít jako doplněk s aktivním uhlím pro úpravu odpadních vod [43].

Jako další lze uvést analytickou metodu ke stanovení DCF pomocí difuzní reflektanční spektroskopie, tj. difuzní odrazivosti ve viditelné oblasti spektra. Barevná reakce se provádí přímo v měřící cele. Všechna měření odrazivosti byla provedena v domácím reflektometru vybaveném červeným LED zdrojem světla a detektorem LDR. Mez detekce byla odhadnuta na přibližně 0,7 mg. mL⁻¹ (2×10^{-3} mol L⁻¹) a příslušná metoda byla použita pro stanovení Diklofenaku v jak pevném, tak i v kapalném farmaceutickém přípravku [44].

Také spektrofluorimetrické detekce Diklofenaku nejsou výjimkou, jedna například využívá tvorbu komplexu mezi Diklofenakem a α -cyklodextrinem (α -CD) a jeho následné fluorescenční maximum, jež je díky CD výrazně zesíleno. Kromě analýzy interakce α -CD-Diklofenak je možné nový přístup pro kvantifikaci Diklofenaku využít i pro stanovení ve farmaceutických přípravcích, a to konkrétně v rozmezí 0-5 mg. mL⁻¹ [45].

Ze spektrálních metod nechybí ani Ramanova spektroskopie s Fourierovou transformací, kdy se pohled upírá na vytvoření vhodné alternativy ke standardním lékopisným metodám při stanovení sodné soli Diklofenaku dávkované jako pevný preparát [46].

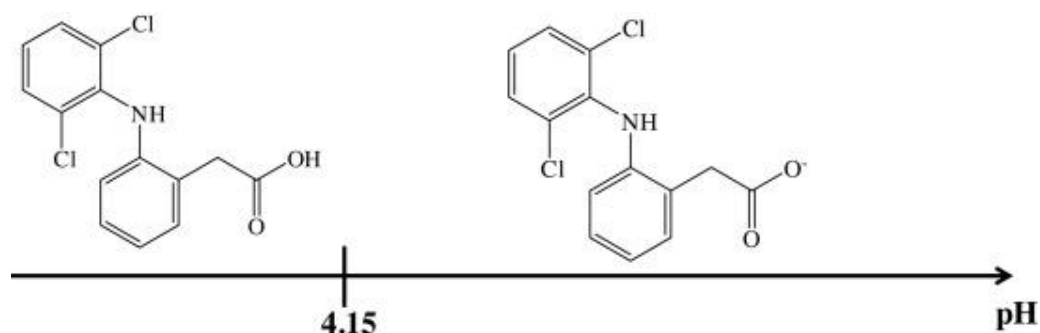
Použitelná je i kapilární zónová elektroforéza s využitím citlivé amperometrické detekce, kdy je jako separační médium / základní elektrolyt používán fosfátový pufr o pH 7,0. Mez detekce byla stanovena $2,5 \times 10^{-6}$ mol. L⁻¹ a postupu bylo využito především pro vzorky lidské moči [47]. Česká skupina pod vedením Z. Malé se zabývá možnostmi detekce DCF elektroforézou v kombinaci s ESI-MS. S využitím off-line SPE uvádí dokonce detekovatelnost pod úrovní 2×10^{-12} mol. L⁻¹ což odpovídá 0,6 ng. L⁻¹ [48].

Překvapivě i tenkovrstvá chromatografie má při stanovování DCF své zastoupení. Jedna studie např. představuje metodu pro stanovení sodné soli DCF ve třech různých volně dostupných gelech: Diclogel[®], Voltaren[®] a Dosanac[®]. Léčivo je z nich nejprve extrahováno, a následně nanese na hliníkovou destičku se silikagelem 60 F254 a vyvíjeno ve směsi toluen / ethylacetát / kyselina octová (ledová). Bodové plochy jsou poté vyhodnocovány rentgenovou absorpční fotometrií při 282 nm. V porovnání s HPLC je zde nižší spotřeba rozpouštědel a značné předpoklady pro rutinní analýzu v surovinách a přípravcích [49].

4.2. Diklofenak: Elektrochemie a elektroanalýza

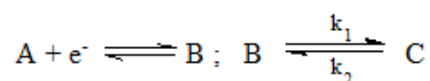
4.2.1. Chování Diklofenaku na uhlíkových elektrodách

Literatura uvádí, že se DCF v závislosti na pH může objevovat ve dvou formách: neutrální a aniontové. Neutrální forma převládá do pH 4,15 a od této hodnoty stupnice kyselosti výše se již vytváří forma aniontová.

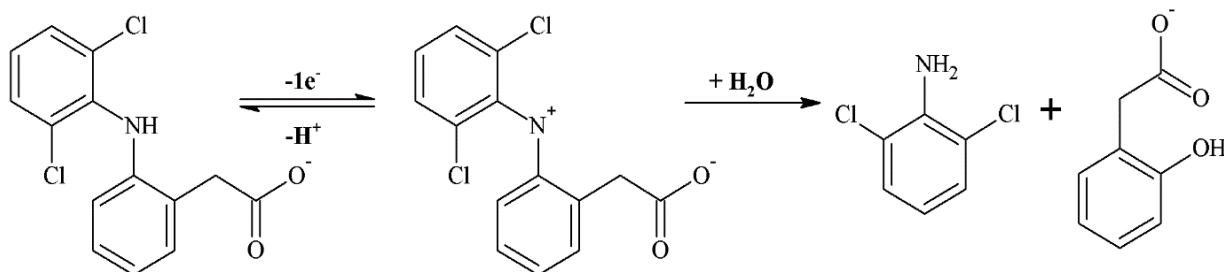


Obr. 7 – Forma Diklofenaku v závislosti na pH

Samotné elektrochemické chování Diklofenaku lze popsat podle obecného EC schématu:



kde k_1 a k_2 jsou rychlostní konstanty reakce dopředné, resp. zpětné (vratné). Konkrétní mechanismus oxidace Diklofenaku lze pak popsat rovnicí podle obrázku 9 [50].



Obr. 8 - EC mechanismus pro oxidaci DCF ve vodném prostředí při pH 7

4.2.2. Přehled metod pro elektroanalytická stanovení DCF

Elektrochemické techniky pro charakterizaci a kvantifikaci Diklofenaku se nabízejí jako slibná alternativa výše představeným separačním a spektrálním měřením, protože nabízejí některé nesporné výhody:

- (i) zkrácení doby analýzy v porovnání s rutinními technikami,
- (ii) nižší náklady na analýzu,
- (iii) dobrou citlivost a selektivitu,
- (iv) v některých případech vzorek nevyžaduje předběžnou úpravu a není tak nutná jeho degradace a deformace [51].

V následujících odstavcích bude představeno několik typických elektroanalytických metod jako příkladů pro možné praktické využití.

4.2.3. Elektrochemické biosenzory

Jedním z výrazných trendů dneška je využívání vysoce selektivních biosenzorů. Jeden takový představil i Shalauddin a kol. Amperometrický biosenzor využívá vícestěnných uhlíkových nanotrubiček (MWCNT, z angl. *Multiwalled Carbon Nanotubes*) a film utvořený z komplexu chitosan-měď a při pH 4,0 dosahuje detekce až $0,021 \mu\text{mol. L}^{-1}$ [52].

Atraktivní je také bez-enzymový elektrochemický imunosenzor založený na úpravě pracovní elektrody elektroimobilizací dvou diazoniových solí. První sůl umožní povrchu afinitní interakce; druhá je pak schopna rozeznat spojení „haptenu-protilátka“ a pokud je Diklofenak přítomen v roztoku, vede to k disociaci protilátky z povrchu elektrody, což vyvolá zvýšení proudu (detekce "signál-on"). Tento imunosenzor dosahuje velmi nízkých mezí detekce; až 20 fM Diklofenaku (tj. 6 pg. L^{-1}) a byl navržen pro kontrolu obsahu DCF v pitné vodě z vodovodního řadu [53].

Jedna ze studií se věnuje tvorbě elektrochemiluminiscenčního imunosenzoru s kovalentním nitridem typu $g\text{-C}_3\text{N}_4$ a ve spojení s oxidovaným grafenu (GO) pro zrychlení přenosu náboje na nanočásticích zlata a nanotrubičkách (MWCNT). Na základě společného působení takto vytvořeného kompozitu, vykazovalo navrhované čidlo vysokou citlivost, dobrou stabilitu a široký lineární rozsah pro kvantifikaci DCF v rozmezí $0,005\text{-}1000 \text{ ng. mL}^{-1}$, s mezí detekce až $1,7 \text{ pg. mL}^{-1}$ [54].

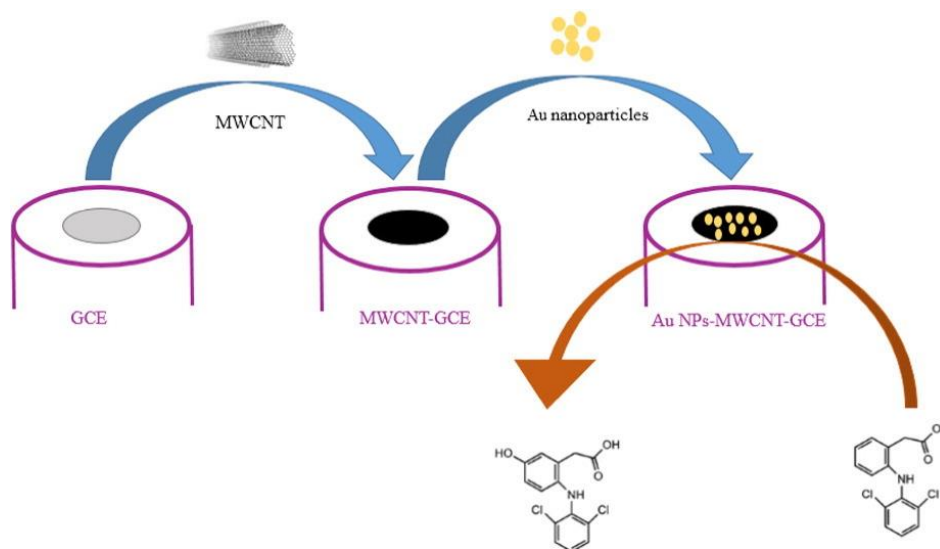
Poslední práce, zařazená do tohoto odstavce, popisuje přípravu a charakterizaci nového potenciometrického senzoru pro stanovení Diklofenaku na bázi chemicky upravených polypyrrolových filmů. Mechanismus odezvy pro navrhovaný snímač je založen

na zabudování DCF aniontu do polypyrrolové struktury během elektrochemické syntézy cyklováním potenciálu za účelem vytvoření membrány se selektivní potenciometrickou odezvou pro ionty, které se podílely na chemické úpravě. Při použití optimálních experimentálních podmínek byla mez detekce $1,9 \times 10^{-4} \text{ mol. L}^{-1}$ a metoda mohla být úspěšně použita při stanovení DCF ve farmaceutických komerčních preparátech v dobré shodě s výsledky stanovení oficiální (referenční) metodou [55].

4.2.4. Stanovení na elektrodách z modifikovaných uhlíkových past

Své místo mezi elektrodami, použitelné k detekci a ke stanovení DCF mají díky svým cenným vlastnostem i uhlíkové elektrody (nejčastěji GCE) a mezi nimi zejména uhlíkové pastové elektrody (CPE) v podobě rozličných modifikovaných variant.

Jednu z možných modifikací elektrody ze skelného uhlíku představil i Azadbakht a kol., kteří využili nanočástic Fe_3O_4 a nanočástic Au spolu s uhlíkovými nanotrubičkami k tvorbě vysoce vodivého filmu, aplikovatelného na povrch GCE. Metoda měla detekční limit 3,4 fM a dvě lineární odezvy, které pokrývají rozsahy koncentrací 0,01 až 1 pM a 10 až 1300 pM DCF [56]. Modifikaci GCE zlatými nanočásticemi a MWCNT využívá i další skupina [57]. Praktické využití zde bylo demonstrováno měřením koncentrace sodné soli Diklofenaku v moči a ve vzorcích léčivých přípravků, které odhalilo, že konfigurace nAu/GCE vykazuje lineární odezvu v rozmezí 0,03-200 μM s mezí detekce 0,02 μM .



Obr. 9 – Příprava a modifikace GCE [57]

Uhlíkové nanotrubičky se používají například i v práci Goodarziana a kol., kteří zvolili jako pojivo uhlíkové pasty iontovou kapalinu typu (1-butyl-3-methylimidazolium)hexafluorofosfát a v režimu SWV dosáhli meze detekce až 0,09 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ [58].

Další modifikací CPE s MWCNT lze docílit přidavkem nanočástic vinylferrocenu, kdy při SWV vykazovala lineární rozsah od 5 do 600 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ a mez detekce 2 $\mu\text{mol. L}^{-1}$. Připravené modifikované CPE byly využity pro měření DCF ve směsi s morfinem a oba poskytované píky byly dobře odděleny a šlo je tak bezpečně vyhodnotit [59].

4.2.5. Ostatní elektroanalytické metody pro detekci DCF

V loňském roce byla také poprvé představena metoda pro stanovení stopového množství Diklofenaku ve vzorku krve. To je umožněno spojením elektromembránové extrakce (EME) a rychlé rozpouštěcí kontinuální cyklické voltametrie s Fourierovou transformací (SFFTCCV). Za daných podmínek se Diklofenak extrahoval (při pH 5) do tenké vrstvy oktanolu imobilizovaného v pórech membrány a poté se přemístil do měřicího roztoku (pH 7), kde došlo k detekci. Metoda vykazovala velmi široký interval linearity signálu s koncentrací v rozmezí od 5 do 1000 ng. mL^{-1} , i v modelových vzorcích krve. Meze detekce a stanovitelnosti byly 1,0 ng. mL^{-1} , resp. 5,0 ng. mL^{-1} [60].

Prezentována byla také selektivní membránová elektroda obsahující β -cyclodextriny [61]. Navrhovaná elektroda může snadno rozlišovat ionty Diklofenaku v přítomnosti hned několika anorganických a organických interferentů, včetně některých běžných lékových excipientů. Doba odezvy je 10 s a může být použita v rozmezí pH 6,2-8,5; nevšední byla zkouška, že senzor vydržel aktivní po dobu 10 měsíců, aniž by došlo k viditelnému zhoršení jeho odezvy. Mezi výhody ISE na Diklofenak patřila také vysoká citlivost a selektivita, a zejména plnohodnotné využití při analýze léků a moči.

Konečně se mezi pracemi objevil i jeden příspěvek, kde ke stanovení DCF byla zvolena neuhlíkatá pracovní elektroda. Šlo o měření v režimu DPV s Pt-elektrodou v elektrolytu z acetonitrilu a TBAClO_4 . Analyt, tj. DCF, vykazoval dva jasně definované píky při 0,87 a 1,27 V, kalibrační křivky byly lineární v rozmezí 2 až 20 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ [62].

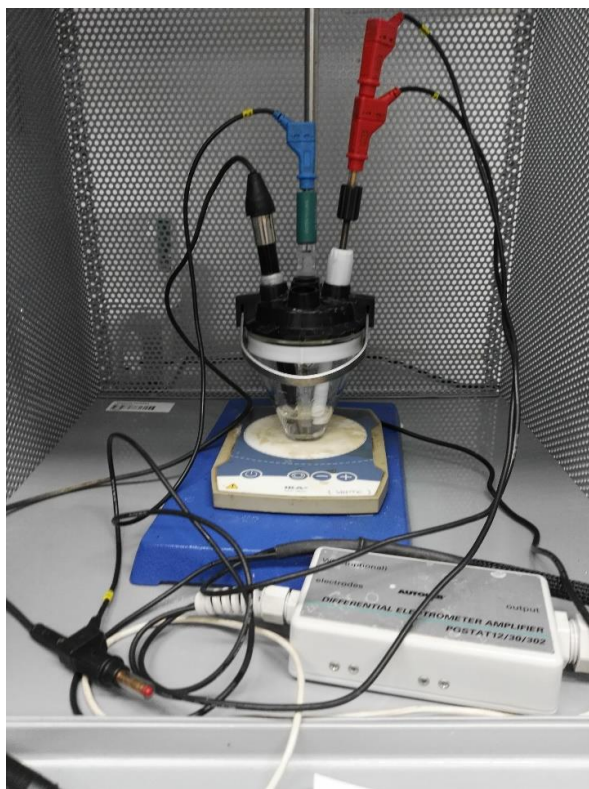
5. Experimentální část

5.1. Chemikálie a roztoky

- uhlíkový prášek „CR-5” (*TESLA Lanškroun, CZ*)
- parafinový olej (*Merck*)
- Diklofenak – sodná sůl; $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$, $M_r = 318,129$ g/mol (*Alfa Aesar, USA*)
- SDS – dodecylsírán sodný; $NaC_{12}H_{25}SO_4$, $M_r = 288,372$ g/mol (*Sigma-Aldrich*)
- CTAB – cetyltrimethylamonium-bromid; $C_{19}H_{42}BrN$, 364,45 g/mol (*Sigma-Aldrich*)
- DBSK – 4-dodecylbenzensulfonová kyselina; $C_{18}H_{30}O_3S$, $M_r = 326,49$ g/mol (*Sigma-Aldrich*)
- NONIDET™ – 4-nonylfenyl-polyethylenglykol; $(C_2H_4O)_x \cdot C_{14}H_{22}O$, $M_w = 680$ g/mol (*Sigma-Aldrich*)
- PolyDADMAC – Polydiallyldimethylamonium-chlorid; $(C_8H_{16}ClN)_n$, $M_w = 275$ g/mol (*Sigma-Aldrich*)
- Hydrogenfosforečnan sodný – $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $M_r = 358,14$ g/mol (*PENTA, CZ*)
- Dihydrogenfosforečnan sodný – $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, $M_r = 156,01$ g/mol (*PENTA, CZ*)
- Hydroxid sodný – NaOH, $M_r = 40,00$ g/mol (*PENTA, CZ*)
- Kyselina boritá – H_3BO_3 , $M_r = 61,83$ g/mol (*PENTA, CZ*)
- Tetraboritan sodný – $Na_2B_2O_7 \cdot 10H_2O$, $M_r =$ g/mol (*PENTA, CZ*)
- Kyselina chlorovodíková, konc. – HCl, $M_r = 36,46$ g/mol (*Sigma-Aldrich*)
- Kyselina octová, ledová – CH_3COOH , $M_r = 60,05$ g/mol (*PENTA, CZ*)
- Deionizovaná voda – připravena v jednotce Milli-Q (*Millipore, USA*)

5.2. Pomůcky a přístroje

- Automatické pipety Eppendorf Research – 10 mL; 100-1000 μ L; 100 μ L (*Eppendorf*)
- AUTOLAB (model "PGSTAT-128N; *Autolab / Metrohm, NL / SUI*)
- pracovní elektroda – uhlíková pastová elektroda CPE
- referentní elektroda – Ag/AgCl/KCl (nas.; *Metrohm*)
- pomocná elektroda – Pt-plíšek (vlastní výroby)
- pH metr IonoLab pH 720



Obr. 10 – Měřicí cela s tříelektrodotvým zapojením (foto autorky)

5.3. Příprava roztoků

1. 0,1 M Fosfátový pufr (PBS)

Roztok A: 0,2 M NaH_2PO_4

→ Na 1L roztoku: 31,20 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, doplněno deionizovanou vodou po rysku

Roztok B: 0,2 M Na_2HPO_4

→ Na 1L roztoku: 71,63 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, doplněno deionizovanou vodou po rysku

Pro potřebné pH byl pak roztok A a B smíchán v poměru dle tabulky.

2. 0,1 M Britton – Robinsonův pufr

Roztok A: 0,04 M H_3PO_4 + 0,04 M CH_3COOH + 0,04 M H_3BO_3

→ Na 1L roztoku: 3 mL H_3PO_4 + 2,28 mL CH_3COOH + 2,47 g H_3BO_3 , doplněno deionizovanou vodou po rysku

Roztok B: 0,2 M NaOH

→ Na 1L roztoku: 8 g NaOH, doplněno deionizovanou vodou po rysku

Pro potřebné pH byl pak roztok A a B smíchán v poměru dle tabulky.

3. Borátový pufr

Roztok A: 0,2 M H_3BO_3

→ Na 250 mL roztoku: 3,1 g H_3BO_3 , doplněno deionizovanou vodou po rysku

Roztok B: 0,05 M borax

→ Na 250 mL roztoku: 4,76 g $\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$

Pro potřebné pH byl pak roztok A a B smíchán v poměru dle tabulky.

4. HCl + NaOH

0,2 M HCl

→ na 0,5 L: 8,35 mL konc. HCl přidáno do deionizované vody a poté doplněno po rysku

0,2 M NaOH

→ na 0,5 L: 4 g NaOH, doplněno deionizovanou vodou po rysku

Pufr o potřebném pH byl získán titrací.

5. Zásobní roztok 0,01 M DCF

Na 100 mL zásobního roztoku: 0,3181 g sodné soli DCF bylo rozpuštěno v 0,05 M NaOH a doplněno po rysku

6. 0,001 M SDS

Na 100 mL: rozpuštěno 0,0289g SDS a doplněno deionizovanou vodou po rysku

7. 0,001 M CTAB

Na 100 mL: rozpuštěno 0,0365 g CTAB a doplněno deionizovanou vodou po rysku

8. 0,0001 M CTAB

Na 100 mL: rozpuštěno 0,00365 g CTAB a doplněno deionizovanou vodou po rysku

9. 0,001 M DBSK

Na 100 mL: naváženo 0,0385g DBSK a doplněno deionizovanou vodou po rysku

10. 0,001 M Nonidet

Na 50 mL: naváženo 0,034 g Nonidet a doplněno deionizovanou vodou po rysku

11. 0,001 M PolyDADMAC

Na 50 mL: naváženo 0,0138 g PolyDADMAC a doplněno deionizovanou vodou po rysku

5.4. Příprava uhlíkové pastové elektrody

20 % CPE: nejdříve byl navážen uhlíkový prášek, dle navážky bylo spočteno nutné množství parafinového oleje.

Příklad: $m_{(CR-5)} = 0,60$ g; pro 20 % CPE odpovídá $m_{(paraf.)} = 0,12$ g

Uhlík s parafinovým olejem byl homogenizován v třecí misce a poté napěchován do elektrodového pouzdra z teflonu.

5.5. Zpracování výsledků

Pro zpracování výsledků byl použit program MS Excel a program NOVA 1.11 pro vyhodnocování odezvy daných analytů; druhý jmenovaný byl součástí použitého analyzátoru.

5.6. Příprava reálných vzorků

Přípravu reálných vzorků prováděla Bc. Barbora Kamenická na pracovišti ÚEnviCHI, z čehož vyplývá i jejich označení (datum; iniciály; číslo vzorku). Před našimi konkrétními elektrochemickými analýzami došlo pouze k ředění vzorku, pokud bylo nutné.

Níže uvedený postup přípravy je převzat z diplomové práce Bc. Barbory Kamenické [66].

5.6.1. Sorpce na granulované aktivní uhlí

Tabulka 2 – Příprava vzorků: Sorpce na GAC I.

Sycení č.	Složení testovacího roztoku	Označení GAC syceného DCF
1	500 mL 25mM DCF + 10 g GAC Hydraffin CC	63BK
2 (223BK1)	200 mL 25mM DCF + 10 g GAC 63BK	63BK1

Tabulka 3 – Příprava vzorků: Sorpce na GAC II.

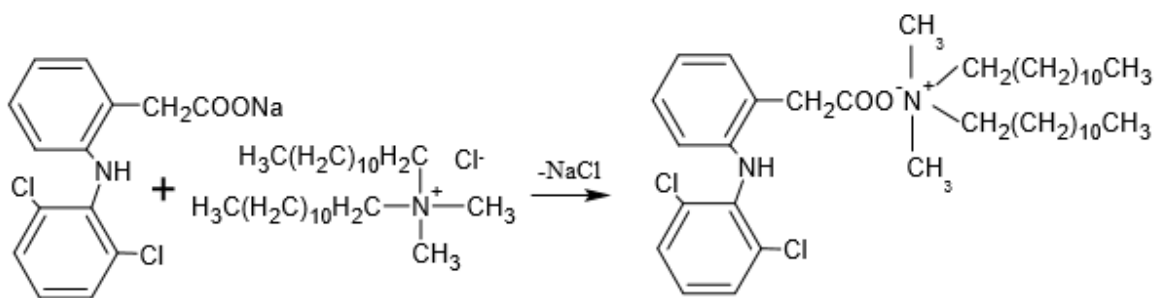
Sycení č.	Složení testovacího roztoku
1 (1104BK)	500 mL 25mM Diklofenaku + 25 g GAC Hydrffin CC
2 (1104BK6)	25 g GAC Hydrffin + filtráty z 1.sycení + 4 g Diklofenaku

5.6.2. Sorpce na biochar

Tabulka 4 – Příprava vzorků: Sorpce na biochar

Exp.č.	Složení testovacího roztoku
223BK2	10 g biocharu Pyreg 400 °C + 200 mL 25mM Diklofenaku
223BK3	10 g biocharu Pyreg 500 °C + 200 mL 25mM Diklofenaku
223BK4	10 g biocharu NovoCarbo + 200 mL 25mM Diklofenaku
44BK2	5 g biocharu Pyreg 400 °C + 100 mL 25mM Diklofenaku
44BK3	5 g biocharu Pyreg 500 °C + 100 mL 25mM Diklofenaku
44BK4	5 g biocharu NovoCarbo + 100 mL 25mM Diklofenaku

5.6.3. Sorpce Diklofenaku na nasycené granulované aktivní uhlí za spolupůsobení kationaktivních tenzidů

**Obr. 11 – Reakční schéma izolace Diklofenaku iontovou výměnou s dilauryldimethylamonium chloridem za vzniku ve vodě nerozpustné sraženiny iontového páru**

Tabulka 5 – Příprava vzorků: Sorpce na nasycené GAC za spolupůsobení tenzidů

Exp.č	Násada
2603BKdik11	5 g GAC (63BK1) + (1 mmol) 0,85 g 50% benzalkonium chloridu + (1mmol) 0,42 g Aliquatu 336 + 100 mL 25mM Diklofenaku
2903BKdik11	5,11 GAC (ze sorpce č. 1D) + (1 mmol) 0,86 g 50% benzalkonium chloridu + (1mmol) 0,41 g Aliquatu 336 + 100 mL 25mM Diklofenaku
44BK1	6,99 g GAC (ze sorpce č. 2D) + 6,99 g GAC 63BK1 + (1 mmol) 0,86 g 50% benzalkonium chloridu + (1mmol) 0,41 g Aliquatu 336 + 100 mL 25mM Diklofenaku
104BK1	1 g impregnačního roztoku 104BK (Aliquat 336 s BAC) + 3 g nas. GAC (63BK1) + 100 mL 25mM Diklofenaku + 100 mL demi vody
104BK2	1 g impregnačního roztoku 104BK (Aliquat 336 s BAC) + 2 g GAC (Hydraffin CC) + 100 ml 25mM Diklofenaku + 100 ml demi vody
104BK3	20 mL roztoku 75mM Aliquatu s 50mM Arquadem (610TW) + 3 g nas. GAC (63BK1) + 100 mL 25mM Diklofenaku + 80 mL demi vody
104BK4	20 mL roztoku 75mM Aliquatu s 50mM Arquadem (610TW) + 2 g GAC (Hydraffin CC) + 100 mL 25mM Diklofenaku + 80 mL demi vody
104BK5	2 g GAC (Hydraffin CC) + 100 mL 25mM Diklofenaku + 100 mL demi vody
124BK1	1 g impregnačního roztoku 104BK (Aliquat 336 s BAC) + 1 g GAC z 104BK1 + 100 mL 25mM Diklofenaku + 100 mL demi vody
124BK2	20 mL roztoku 75mM Aliquatu s 50mM Arquadem (610TW) + GAC z 104BK3 + 100 mL 25mM Diklofenaku + 80 mL demi vody
124BK4	2 mL Luviquat FC 370 + 100 mL Diklofenaku + 98 mL demi vody + 3 g nas. GAC (114BK1)
124BK5	2 mL poly(diallyldimethylamonium chlorid) + 100 mL 25mM Diklofenaku + 98 mL demi vody + 3 g nas. GAC (114BK1)

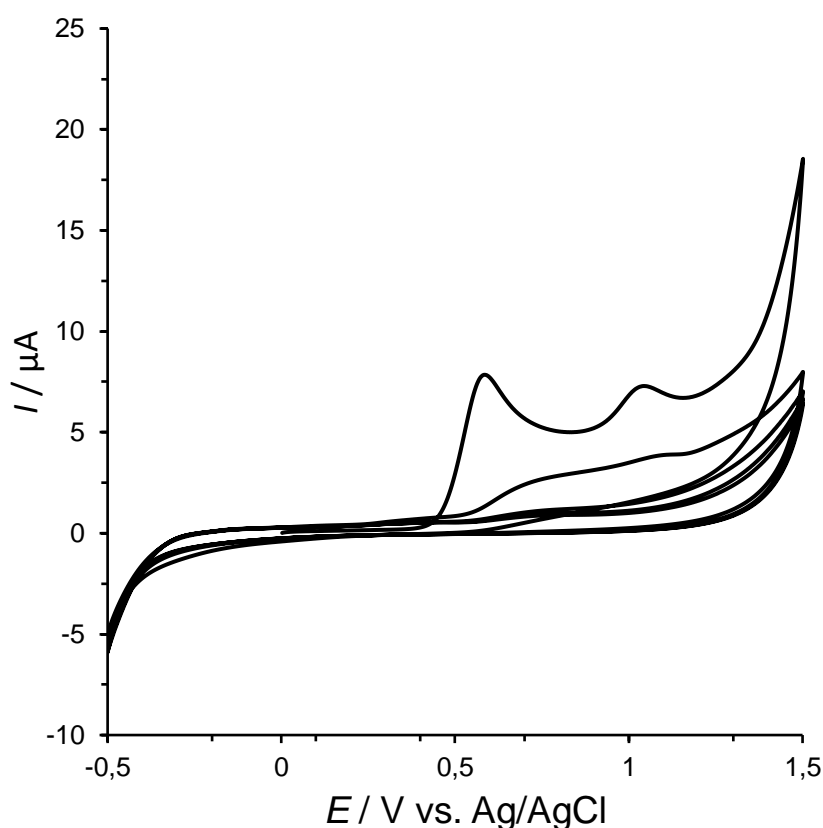
U vzorku 63BK2 a 63BK3 na přání spolupracovníků z ÚEnviCHI není postup uveden; využit byl speciální, nově navržený kationaktivní tenzid, jehož příprava a složení ještě nebyly publikovány.

6. Výsledky a diskuze

6.1. Základní elektrochemická studie Diklofenaku

6.1.1. Cyklická voltametrie

K charakterizaci základního elektrochemického chování Diklofenaku na uhlíkové pastové elektrodě bylo využito cyklické voltametrie [63, 64, 65]. Ve souladu, s již popsaným mechanismem oxidace (str. 27), lze z chybějících píků, resp. z „hladkého“ průběhu katodické větve, usuzovat, že v případě CPE byl pozorovaný děj ireversibilní. Na anodické větvi jsou opět zřetelné dva oxidační píky, s maximy kolem +0,6 V a +1,1 V vs. ref., jejichž velikost i poloha byla silně závislá na složení elektrolytu (viz tab. č. 2) a na počtu cyklů (viz obr. 12).



Obr. 12 – *Cyklický voltamogram při $pH = 8$. Experimentální podmínky: CV; 0,1 M BRB; $c_{(\text{DCF})} = 500 \mu\text{M}$; scan: -0,5 až 1,5 V vs. Ag/AgCl; $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; 5 cyklů.*

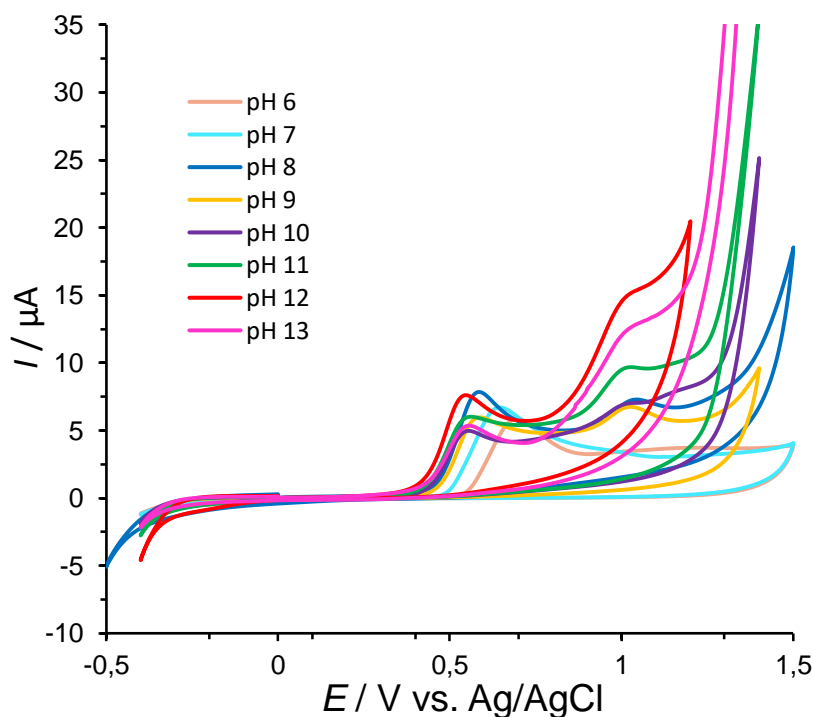
6.1.2. Vliv pH na odezvu Diklofenaku

Ze závislosti odezvy proudu na pH je patrné, že při pH = 7 jsou hodnoty pro první pík zřetelně vyšší a zároveň druhý pík, který odpovídal druhému kroku EC mechanismu (tedy chemické oxidaci DCF) se postupně vytrácel. Při zásaditějším pH již docházelo k výrazným nárůstům větve při vyšším vkládaném potenciálu (cca 1,2 až 1,5 V), zatímco u kyselých pH byl trend opačný.

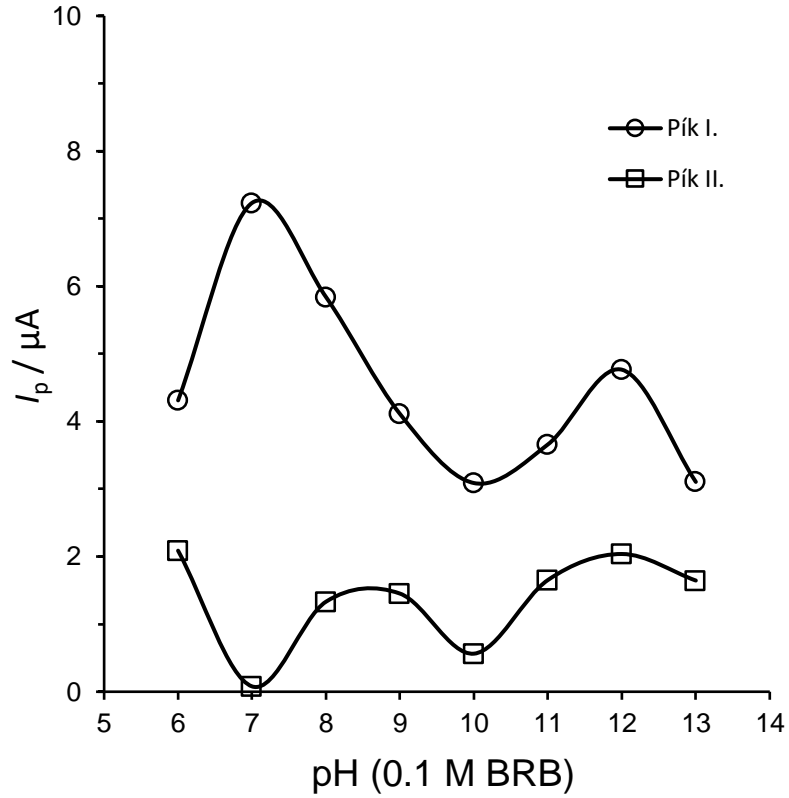
Co se týče polohy maxima píku I., ten s rostoucím pH pozvolna klesal; při pH = 7 byla průměrná hodnota rovna $E_p = 0,6421$ V.

Tabulka 6 - CV: Odezva 500 μ M DCF při různých pH

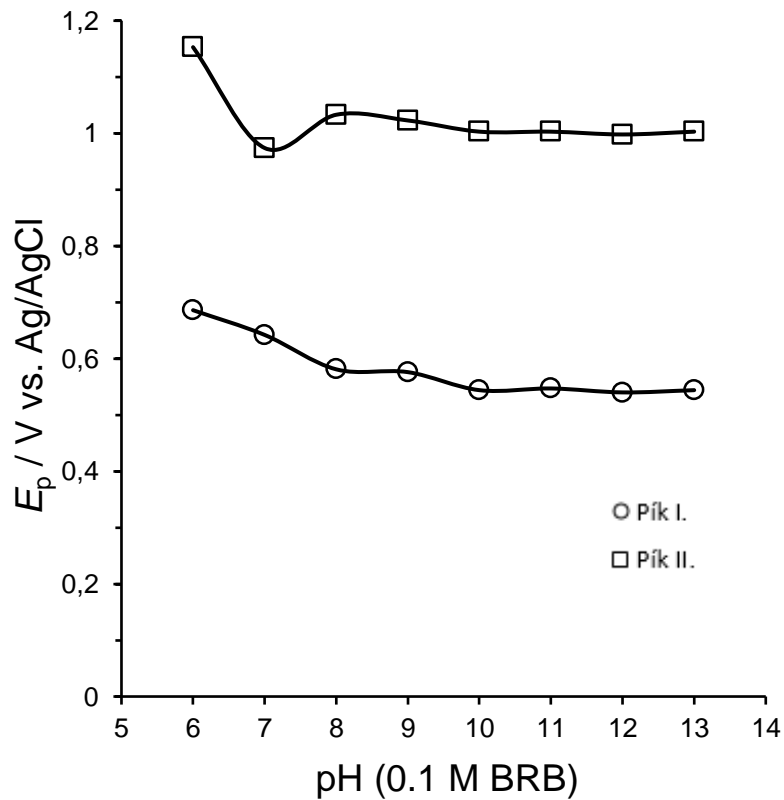
pH	Pík I.		Pík II.	
	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A
6	0,686	4,311	1,153	2,087
7	0,642	7,233	0,974	0,079
8	0,581	5,840	1,033	1,332
9	0,576	4,110	1,023	1,452
10	0,544	3,088	1,003	0,563
11	0,547	3,659	1,003	1,653
12	0,540	4,765	0,998	2,038
13	0,544	3,105	1,003	1,645



Obr. 13 – Cyklické voltamogramy při pH 6 až 13. Experimentální podmínky: CV; 0,1 M BRB; $C_{(DCF)} = 500$ μ M; scan: -0,5 až 1,5 V vs. Ag/AgCl; 50 $mV \cdot s^{-1}$; 5 cyklů (zobrazen 1).



Obr. 14 – Závislost odezvy proudu pro 500 μM DCF v režimu CV pro pH 6 až 13. Experimentální podmínky: CV; 0,1 M BRB; $c_{(DCF)} = 500 \mu M$; scan: -0,5 až 1,5 V vs. Ag/AgCl; 50 $mV \cdot s^{-1}$; 5 cyklů.



Obr. 15 – Závislost odezvy potenciálu pro 500 μM DCF v režimu CV pro pH 6 až 13. Experimentální podmínky: CV; 0,1 M BRB; $c_{(DCF)} = 500 \mu M$; scan: -0,5 až 1,5 V vs. Ag/AgCl; 50 $mV \cdot s^{-1}$; 5 cyklů.

6.2. Vývoj voltametrické metody ke stanovení Diklofenaku: Optimalizace klíčových experimentálních parametrů

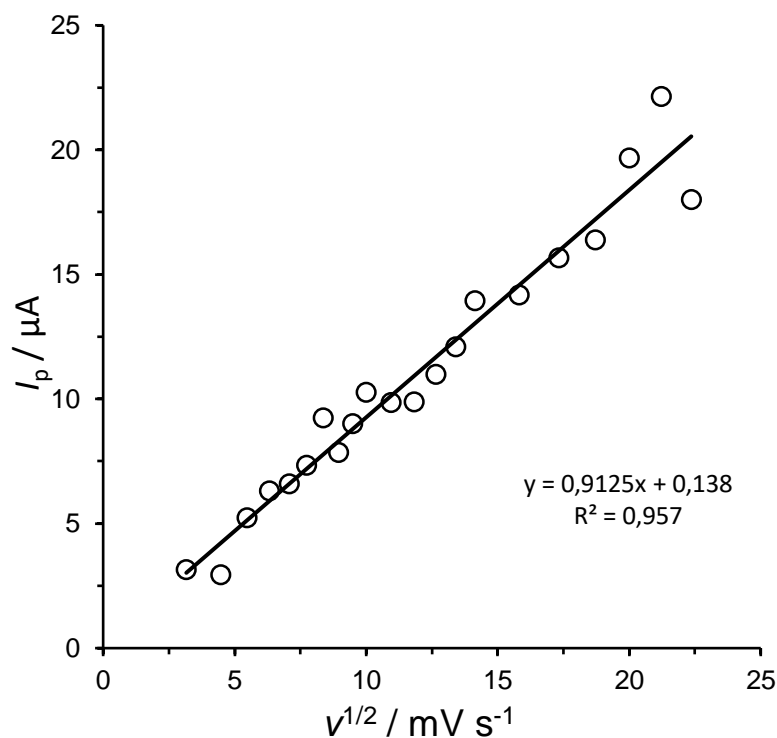
6.2.1. Měření v lineárním módu

Lineární voltametrie (LSV) je vhodná technika pro studium základních přístrojových parametrů pro svou jednoduchost analytické odezvy a jednoduchou modulaci potenciálové rampy [63,64,65].

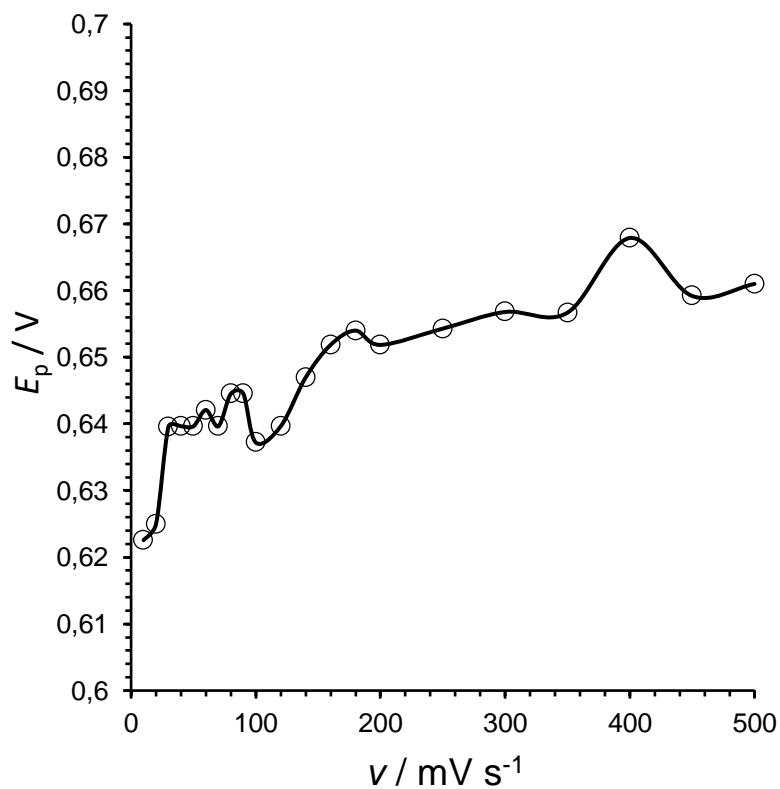
Studium závislosti rychlosti změny potenciálu („scan“)

Jedním z klíčových parametrů LSV je rychlost změny nárůstu/poklesu potenciálu, a proto mu byla věnována náležitá pozornost. Ačkoli se zvyšující se rychlosti se zvyšovala i odezva, není vhodné vyšších hodnot využívat, jelikož docházelo také ke zvýšení odezvy druhého oxidačního píku a snížení „výšky“ píku (viz obr. 17). S rostoucím v docházelo také k posunu hodnot maxima výšky píku E_p . Jako optimální rychlost scanu byla tedy vzata $v = 40 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

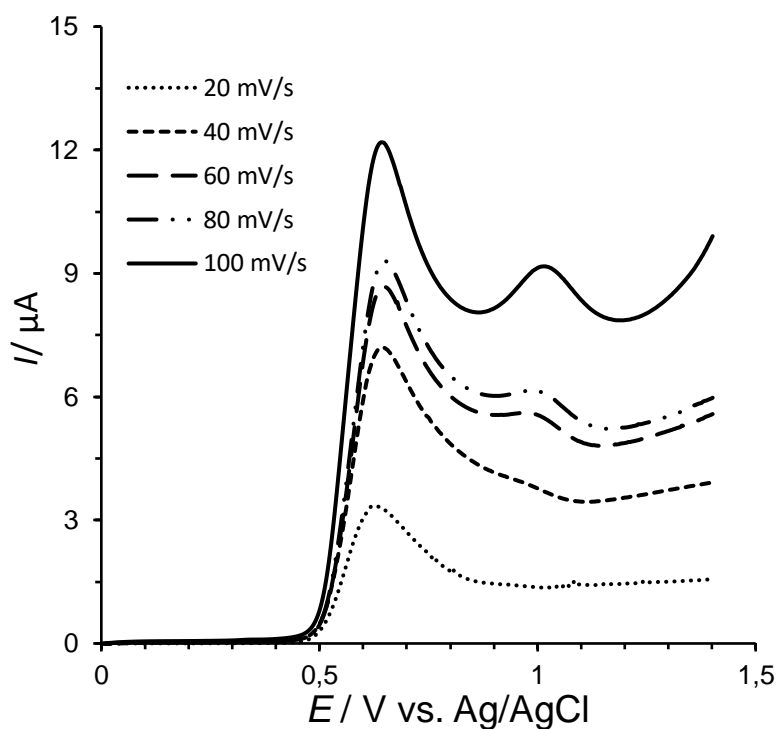
Parametry optimalizace: rozsah 0 až 1,4 V; $E_{\text{step}} = 2,5 \text{ mV}$; měřeno pro koncentraci 500 μM DCF.



Obr. 16 – Závislost I_p pro $500 \mu M$ na odmocnině rychlosti nárůstu potenciálu. Experimentální podmínky: LSV; $0,1 M$ PBS; $pH=7$; $c_{(DCF)} = 500 \mu M$; scan: 0 až $1,4 V$ vs. $Ag/AgCl$; $50 mV \cdot s^{-1}$; $E_{step} = 2,5 mV$.



Obr. 17 – Závislost E_p na rychlosti nárůstu potenciálu pro $500 \mu M$. Experimentální podmínky: LSV; $0,1 M$ PBS; $pH=7$; $c_{(DCF)} = 500 \mu M$; scan: 0 až $1,4 V$ vs. $Ag/AgCl$; $50 mV \cdot s^{-1}$; $E_{step} = 2,5 mV$.



Obr. 18 – Závislost I_p pro $500 \mu\text{M}$ při různých rychlostech nárůstu potenciálu. Experimentální podmínky: LSV; $0,1 \text{ M PBS}$; $\text{pH} = 7$; $c_{(\text{DCF})} = 500 \mu\text{M}$; scan: 0 až $1,4 \text{ V vs. Ag/AgCl}$; 20 až $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 2,5 \text{ mV}$.

Kontrola opakovatelnosti signálu v režimu LSV byla provedena při optimální rychlosti scanu ($40 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) pro $500 \mu\text{M DCF}$. Z relativní směrodatné odchylky (RSD, z angl. *Relative Standard Deviation*), která byla $1,5 \%$ se potvrdilo, že metoda byla vhodně nastavena.

Tabulka 7 - Kontrola opakovatelnosti pro LSV

n	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$
1	0,640	6,903
2	0,640	6,936
3	0,637	7,239
4	0,640	6,933
5	0,637	6,862
\bar{x}	0,639	6,975
σ	0,001	0,106
RSD	0,199	1,518

6.2.2. Měření v diferenčně pulzním režimu

Diferenčně pulzní voltametrie (DPV), je technika využívaná pro svou zvýšenou citlivost a analytickou odezvu, a to především díky speciální modulaci vkládaného potenciálu, a proto nemůže chybět ve studii při hledání vhodné techniky pro praktické elektroanalytické měření [63, 64, 65].

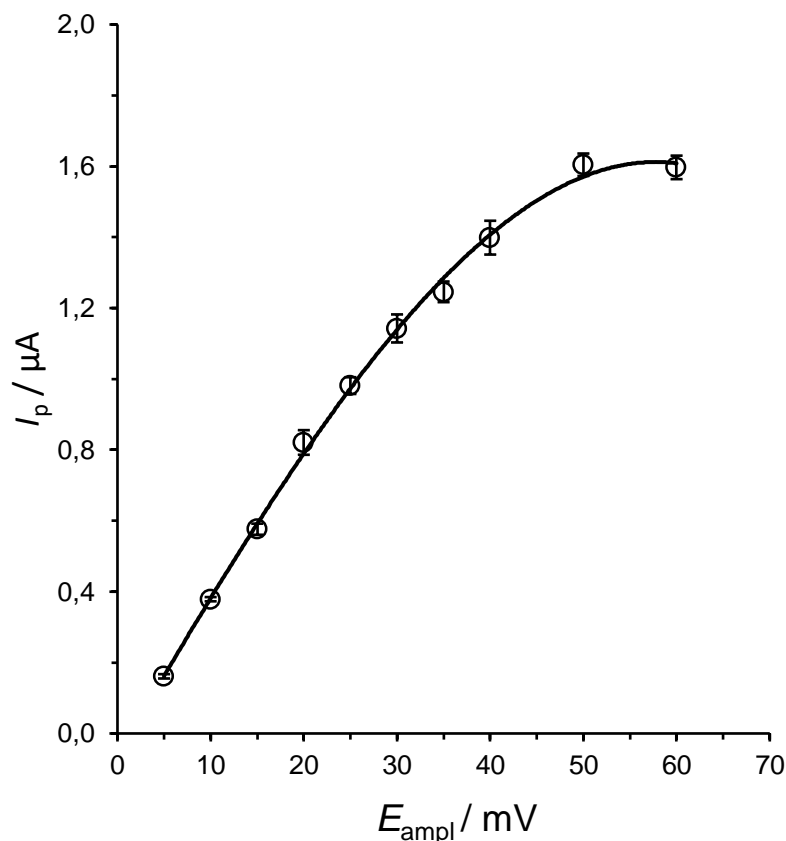
Amplituda

Mezi hlavní z parametrů techniky patří amplituda, na jejíž velikosti mimo jiné závisí také odezva, resp. výška píku. Ze závislosti I_p na amplitudě bylo možno posoudit že vyšší odezvy nastávaly při amplitudě nad 50 mV, avšak pak rostla i odchylka měření, proto bylo 50 mV vzato jako optimálních.

Parametry optimalizace: $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; rozsah 0-1,4 V; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, Interval time = 0,1 s; Modulation time = 0,05 s; měřeno pro koncentraci 50 μM DCF.

Tabulka 8 - DPV: Optimalizace amplitudy

Amplituda / mV	I/ μA	I/ μA	I/ μA	I/ μA	I/ μA	x / μA	σ	RSD %
5	0,158	0,162	0,162	0,175	0,150	0,161	0,006	3,779
10	0,376	0,381	0,391	0,366	0,379	0,379	0,006	1,575
15	0,599	0,584	0,584	0,563	0,550	0,576	0,016	2,722
20	0,864	0,865	0,774	0,804	0,798	0,821	0,035	4,231
25	0,992	0,974	1,013	0,998	0,930	0,981	0,024	2,408
30	1,126	1,172	1,211	1,061	1,145	1,143	0,040	3,462
35	1,184	1,260	1,278	1,235	1,272	1,246	0,029	2,335
40	1,471	1,388	1,385	1,305	1,445	1,399	0,048	3,407
50	1,677	1,611	1,538	1,604	1,592	1,604	0,032	1,972
60	1,609	1,536	1,643	1,622	1,575	1,597	0,033	2,076



Obr. 19 – Optimalizace amplitudy v režimu DPV pro $50 \mu\text{M}$ DCF. Experimentální podmínky: DPV; $0,1 \text{ M}$ PBS; $c_{(\text{DCF})} = 50 \mu\text{M}$; scan: 0 až $1,4 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl; $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$

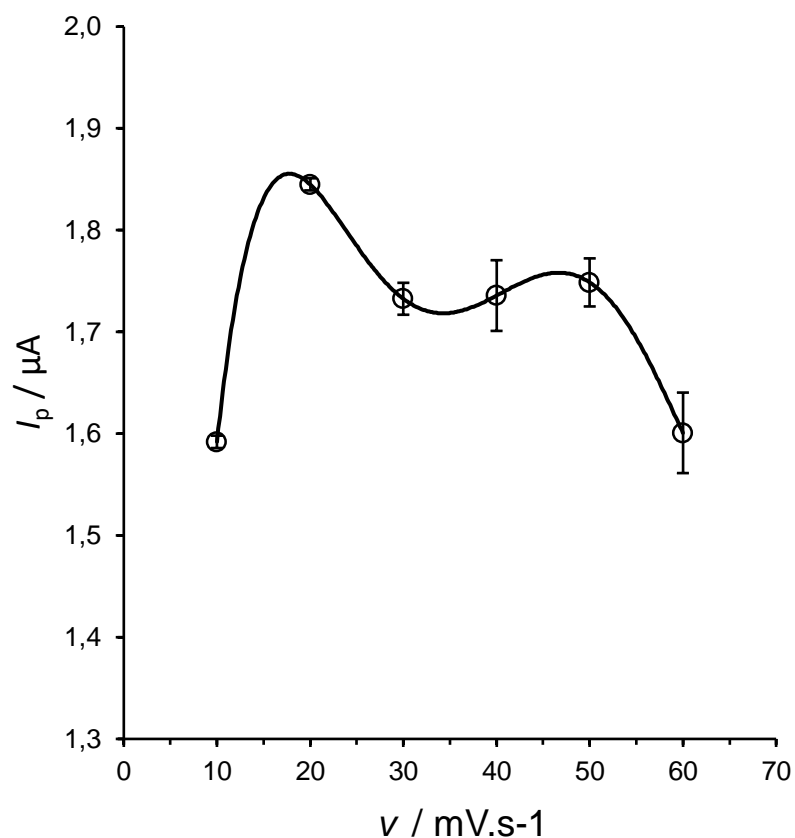
Rychlost nárůstu potenciálu

Další důležitý parametr měřicí techniky ve voltametrickém módu je rychlost nárůstu potenciálu. Podle obrázku 20 vidíme, že jasně nejvyšší odezvu a zároveň i nízkou odchylku měla $v = 20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Parametry optimalizace: amplituda 50 mV ; rozsah 0 až $1,4 \text{ V}$; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$; Modulation time = $0,05 \text{ s}$; Interval Time = $0,5 \text{ s}$

Tabulka 9 - DPV: Optimalizace rychlosti nárůstu potenciálu.

$v / \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$	$I / \mu\text{A}$	$I / \mu\text{A}$	$I / \mu\text{A}$	$I / \mu\text{A}$	$I / \mu\text{A}$	$x / \mu\text{A}$	σ	RSD %
10	1,502	1,574	1,645	1,618	1,621	1,592	0,043	2,720
20	1,854	1,776	1,834	1,925	1,836	1,845	0,036	1,931
30	1,764	1,755	1,599	1,745	1,800	1,733	0,054	3,091
40	1,827	1,730	1,723	1,644	1,755	1,736	0,044	2,556
50	2,086	1,673	1,631	1,629	1,724	1,749	0,135	7,721
60	1,676	1,615	1,619	1,511	1,583	1,601	0,043	2,680



Obr. 20 – Optimalizace rychlosti nárůstu potenciálu v režimu DPV pro 50 μM DCF. Experimentální podmínky: DPV; 0,1 M PBS; $c_{(\text{DCF})} = 50 \mu\text{M}$; scan: 0 až 1,4 V vs. Ag/AgCl; amplituda 50 mV; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$.

Kontrola opakovatelnosti DPV byla provedena při optimální amplitudě (50 mV) a rychlosti scanu (20 mV.s^{-1}) pro 50 μM DCF. RSD byla 1,35 % a z hodnoty lze opět usoudit vhodné nastavení metody.

Tabulka 10 - Kontrola opakovatelnosti pro DPV

n	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$
1	0,579	0,911
2	0,579	0,922
3	0,579	0,931
4	0,574	0,932
5	0,569	0,963
\bar{x}	0,576	0,932
σ	0,004	0,013
RSD	0,629	1,348

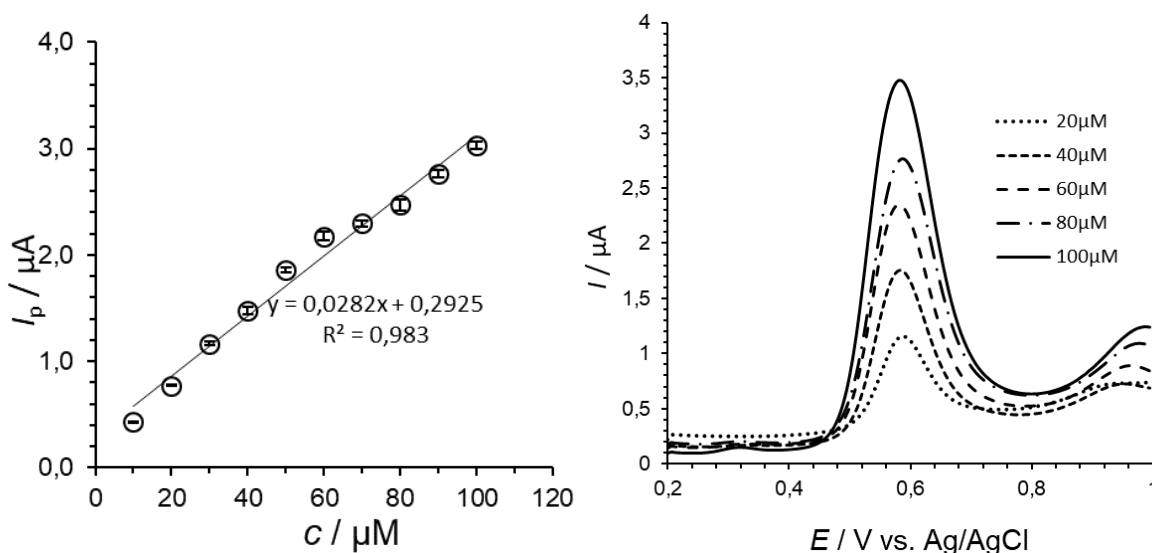
Kalibrační řada

Další důležitá věc je zjištění, jak se bude chovat pracovní elektroda za podmínek měření v roztocích, obsahujících různé koncentrace analytu. Metodou standardního přídatku bylo toto chování ověřeno a na obr. 21 lze vidět průběh.

Parametry metody: Standardní přídatek 10 μL zásobního roztoku, 0,1 M PBS pH = 7; rozsah 0,2 až 1 V, amplituda 50 mV; $v = 20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Tabulka 11 - DPV: metoda standardního přídatku

$c / \mu\text{M}$	$I / \mu\text{A}$	$I / \mu\text{A}$	$I / \mu\text{A}$	$x / \mu\text{A}$	σ	RSD %
10	0,426	0,400	0,473	0,433	0,027	6,192
20	0,781	0,723	0,810	0,772	0,032	4,189
30	1,198	1,084	1,217	1,166	0,055	4,704
40	1,436	1,465	1,542	1,481	0,041	2,735
50	1,953	1,845	1,796	1,865	0,059	3,165
60	2,241	2,276	2,017	2,178	0,107	4,922
70	2,241	2,287	2,371	2,300	0,048	2,066
80	2,385	2,650	2,375	2,470	0,120	4,852
90	2,763	2,811	2,721	2,765	0,031	1,108
100	3,141	3,145	2,800	3,029	0,152	5,031
200	4,625	4,306	4,456	4,462	0,108	2,430



Obr. 21 – Kalibrační řada v režimu DPV. **Vlevo:** kalibrační křivka, proložená lineární regresí **vpravo:** voltamogramy získané analýzou roztoků. Experimentální podmínky: DPV; 0,1 M PBS pH = 7; $SP_{(DCF)} = 10 \mu\text{M}$; scan: 0,2 až 1 V vs. Ag/AgCl; amplituda 50 mV; $v = 20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$.

6.2.3. Měření v režimu SWV

Druhou prakticky využívanou technikou s modulovanou rampou je Square-Wave Voltametrie (SWV), jejichž výkonnost tak byla testována rovněž [63, 64, 65].

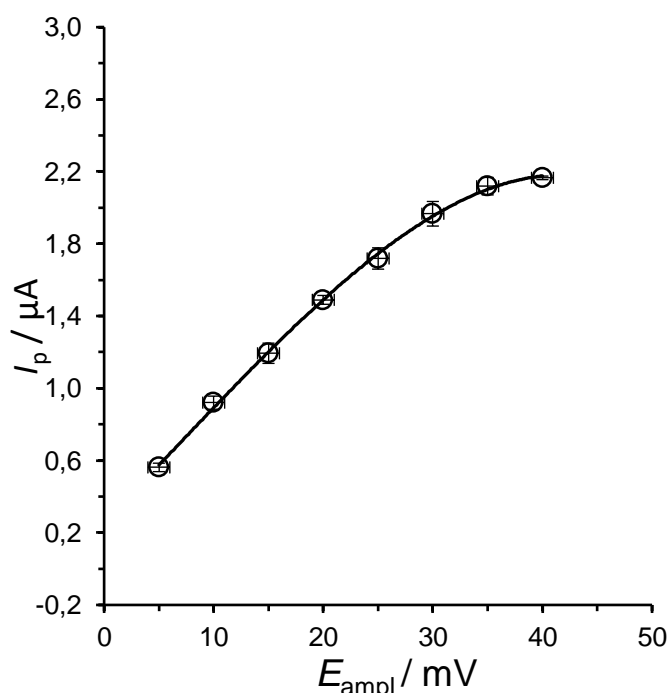
Amplituda

Ze závislosti I_p na amplitudě a RSD lze říci, že jako optimální hodnotu amplitudy lze považovat 40 mV.

Parametry optimalizace: $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; rozsah 0-1,4 V; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$; Inter. time = 0,1 s; $f = 10 \text{ Hz}$; měřeno pro koncentraci $50 \mu\text{M DCF}$.

Tabulka 12 – SWV: Optimalizace amplitudy

Amplituda / mV	I / μA	I / μA	I / μA	x / μA	σ	RSD %
5	0,534	0,597	0,555	0,562	0,023	4,178
10	0,866	0,948	0,947	0,920	0,036	3,942
15	1,278	1,165	1,140	1,194	0,056	4,701
20	1,474	1,468	1,527	1,490	0,025	1,645
25	1,784	1,631	1,742	1,719	0,059	3,424
30	1,872	1,959	2,069	1,967	0,068	3,462
35	2,113	2,192	2,053	2,119	0,048	2,286
40	2,178	2,168	2,151	2,166	0,010	0,463



Obr. 22 – Optimalizace amplitudy v režimu SWV pro $50 \mu\text{M DCF}$. Experimentální podmínky: SWV; 0,1 M PBS; $c_{(\text{DCF})} = 50 \mu\text{M}$; scan: 0 až 1,4 V vs. Ag/AgCl; $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$.

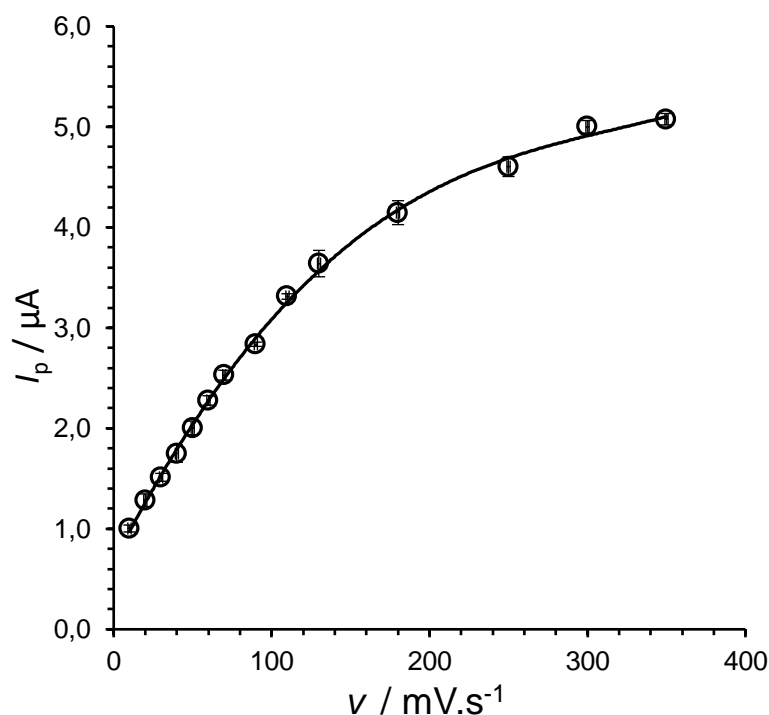
Rychlost nárůstu potenciálu

Druhý hlavní parametr metody je opět rychlost nárůstu potenciálu. Podle tabulky 9 lze usoudit, že hodnoty 90 a 110 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ měly jasně nejnižší RSD, ačkoliv pro vyšší hodnoty scanu byly vyšší odezvy, nicméně s horšími odchylkami. Jako optimum byla vzata hodnota mezi 90 a 110, tedy $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Parametry optimalizace: amplituda 40 mV; rozsah 0 až 1,4 V; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$; měřeno pro koncentraci 50 μM DCF.

Tabulka 13 - SWV: Optimalizace rychlosti nárůstu potenciálu

$v / \text{mV s}^{-1}$	$I / \mu\text{A}$	$I / \mu\text{A}$	$I / \mu\text{A}$	$x / \mu\text{A}$	σ	RSD %
10	1,046	1,013	0,951	1,003	0,035	3,457
20	1,273	1,201	1,378	1,284	0,063	4,881
30	1,571	1,459	1,507	1,512	0,039	2,589
40	1,618	1,816	1,811	1,748	0,087	4,971
50	2,041	1,903	2,070	2,005	0,068	3,374
60	2,239	2,245	2,348	2,277	0,047	2,057
70	2,472	2,603	2,514	2,529	0,049	1,928
90	2,857	2,847	2,805	2,837	0,021	0,741
110	3,331	3,334	3,271	3,312	0,027	0,821
130	3,773	3,442	3,703	3,639	0,131	3,612
180	4,105	4,324	4,009	4,146	0,119	2,867
250	4,457	4,608	4,744	4,603	0,097	2,112
300	5,058	5,037	4,906	5,000	0,063	1,255
350	4,990	5,096	5,141	5,076	0,057	1,124



Obr. 23 – Optimalizace rychlosti nárůstu potenciálu v režimu SWV pro 50 μM DCF. Experimentální podmínky: SWV; 0,1 M PBS; $c_{(\text{DCF})} = 50 \mu\text{M}$; scan: 0 až 1,4 V vs. Ag/AgCl; amplituda 40 mV; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$.

Kontrola opakovatelnosti DPV byla provedena při zvolené amplitudě (40 mV) a rychlosti scanu (100 mV.s^{-1}) pro 50 μM DCF. Z RSD která je rovna 1,7 % je potvrzeno, že metoda byla vhodně nastavena.

Tabulka 14 - SWV: Kontrola opakovatelnosti

n	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$
1	0,5992	1,4175
2	0,5891	1,4876
3	0,5891	1,4608
4	0,5891	1,4279
5	0,5942	1,4239
\bar{x}	0,5922	1,4435
σ	0,0036	0,0245
RSD	0,6124	1,6992

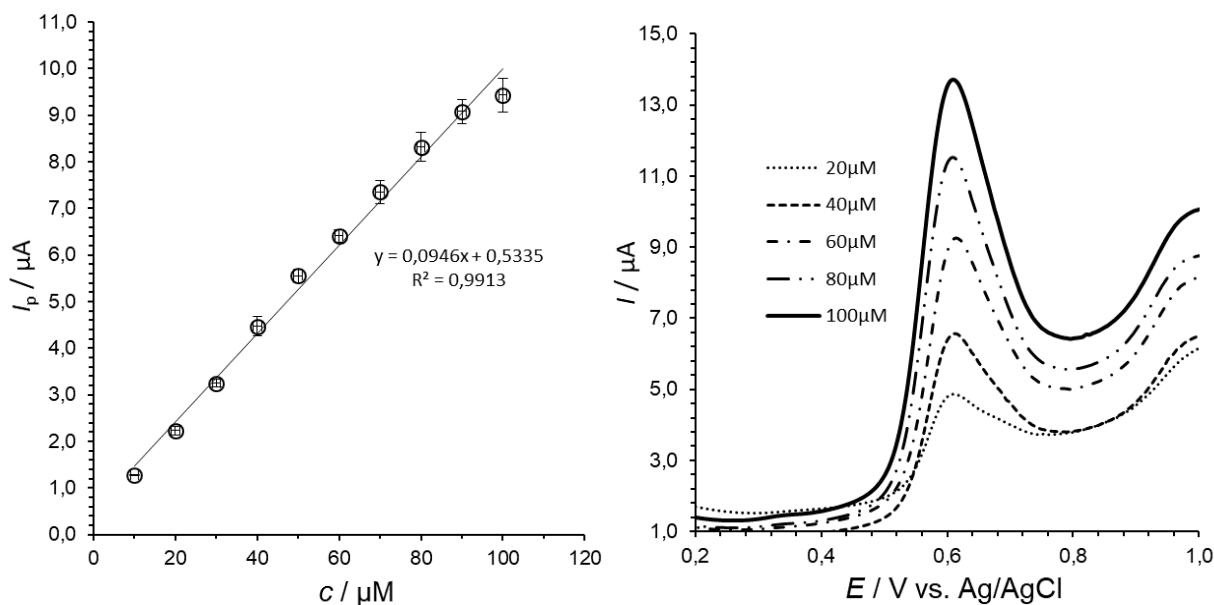
Kalibrační řada

Opět jako u DPV tak i při této technice bylo ověřováno chování elektrody a použité techniky při různých koncentracích Diklofenaku. Průběh lze vidět na obr. č. 24.

Parametry metody: Standardní přírůstek 10 μL zásobního roztoku, 0,1 M PBS pH = 7; rozsah 0,2 až 1 V, amplituda 40 mV; $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Tabulka 15 - SWV: metoda standardního přírůvku

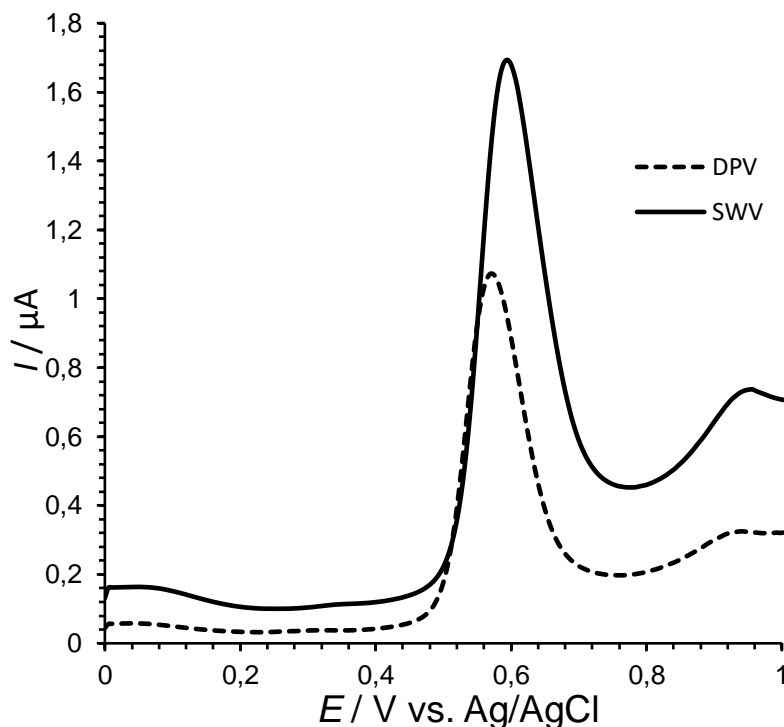
$c / \mu\text{M}$	$I / \mu\text{A}$	$I / \mu\text{A}$	$I / \mu\text{A}$	$x / \mu\text{A}$	σ	RSD %
10	1,268	1,289	1,286	1,281	0,008	0,659
20	2,340	2,093	2,254	2,229	0,090	4,054
30	3,387	3,222	3,145	3,252	0,090	2,775
40	4,302	4,340	4,777	4,473	0,203	4,533
50	5,585	5,339	5,749	5,558	0,146	2,627
60	6,616	6,325	6,292	6,411	0,137	2,132
70	7,099	7,722	7,244	7,355	0,245	3,329
80	8,754	7,843	8,352	8,316	0,315	3,793
90	8,998	9,466	8,786	9,083	0,255	2,807
100	9,983	9,126	9,188	9,433	0,367	3,893
150	12,625	12,345	12,815	12,595	0,167	1,323
200	15,431	15,533	14,760	15,241	0,321	2,105



Obr. 24 – Kalibrační řada v režimu SWV. **Vlevo:** kalibrační křivka, proložená lineární regresí **vpravo:** voltamogramy získané analýzou roztoků. Experimentální podmínky: SWV; 0,1 M PBS pH = 7; $SP_{(\text{DCF})} = 10 \mu\text{M}$; scan: 0,2 až 1 V vs. Ag/AgCl; amplituda 40 mV; $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $f = 60 \text{ Hz}$; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$.

6.2.4. Porovnání SWV vs. DPV

Rozhodneme-li se porovnat obě tyto techniky při stejných podmínkách a pro stejnou relativně nízkou koncentrační úroveň Diklofenaku, vychází ve výsledku lepší odezva pro SWV, jak je vidět na obr. 25. U organických látek je taková relace poměrně neobvyklá — často vychází lépe měření s modulací DPV — a v případě DFC to může svědčit o rychlém průběhu první (a hlavní) elektrodové reakce během oxidace molekuly.



Obr. 25 – Porovnání odezvy DPV vs. SWV pro 50 μM DCF. Experimentální podmínky: 0,1 M PBS pH = 7; $c_{(\text{DCF})} = 50 \mu\text{M}$; scan: 0,2 až 1 V vs. Ag/AgCl; amplituda 25 mV; $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$.

6.2.5. Vliv přidavku tenzidů na odezvu

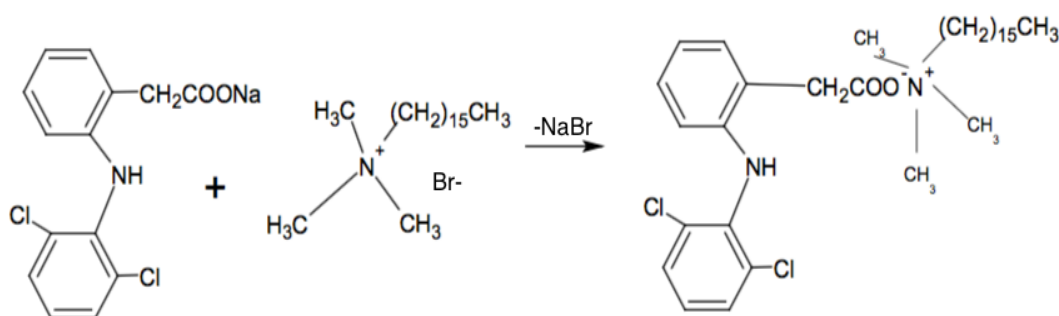
Tenzidy neboli povrchově aktivní látky (PAL), jsou látky, které ovlivňují povrchové napětí roztoků, snižují ho a mohou také zvyšovat rozpustnost látek jinak špatně rozpustných. Existují dvě velké skupiny PAL: ionogenní a neionogenní. Ionogenní PAL lze ještě rozdělit na kationaktivní – mají ve vodném roztoku kladný náboj; a anionaktivní – ve vodném roztoku náboj záporný [67]. PAL tvoří také s některými organickými molekulami iontové páry, a právě tohoto se využívá při jejich případném odstraňování.

V případě elektrod typu CPE se přítomnost tenzidu v roztoku projeví ještě jedním, specifickým způsobem – lipofilní části molekul dané PAL silně přilnou na povrch uhlíkové pasty, který je z podstaty hydrofobní (tj. také lipofilní) a následně odpuzují molekuly pojiva

stejného charakteru. Výsledkem je potom zvláštní typ modifikace, tzv. *eroze povrchu* CPE [68], kdy se více obnaží uhlíkové částice a takto upravená povrchová vrstva vykazuje vyšší afinitu k hydrofilním látkám a celkově příznivější reakční kinetiku, než původní pasta (před stykem s PAL).

V našem případě byla zkoušena přítomnost všech tří typy tenzidů a jejich účinek na odezvu:

- CTAB – cetyltrimethylamonium-bromid; kationaktivní
- SDS – dodecylsírán sodný; anionaktivní
- NONIDET™ - 4-nonylfenyl-polyethylenglykol; neionogenní
- PolyDADMAC - Polydiallyldimethylamonium-chlorid; kationaktivní
- DBSK – 4-dodecylbenzensulfonová kyselina; anionaktivní

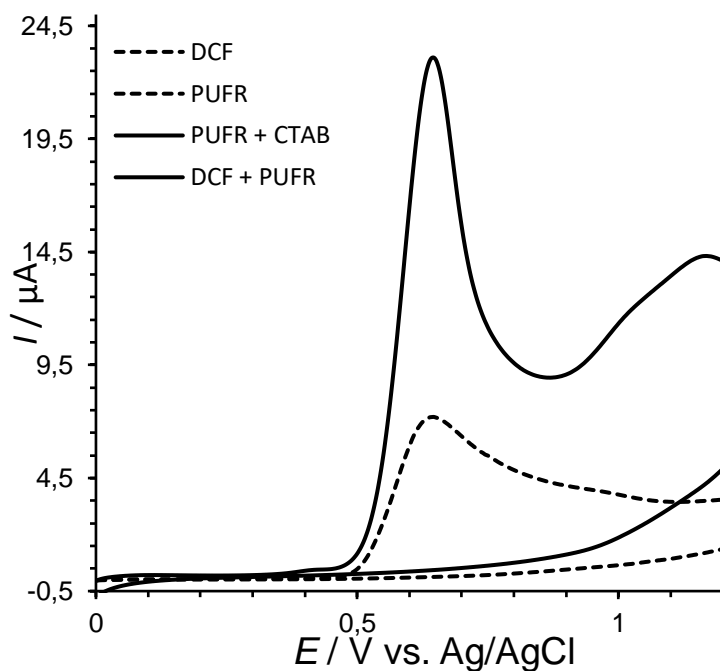


Obr. 26 – Reakční schéma tvorby iontového páru DCF-CTAB.

Zkoušeny byly dva postupy měření – při prvním byl nejdříve dán k základnímu pufru přídavek zásobního roztoku DCF a poté přídavek tenzidu, při druhém se nejdříve přidal tenzid, jež modifikoval povrch elektrody a až poté přídavek DCF. Druhý způsob měl lepší odezvy, a proto se již dále první způsob nevyužíval.

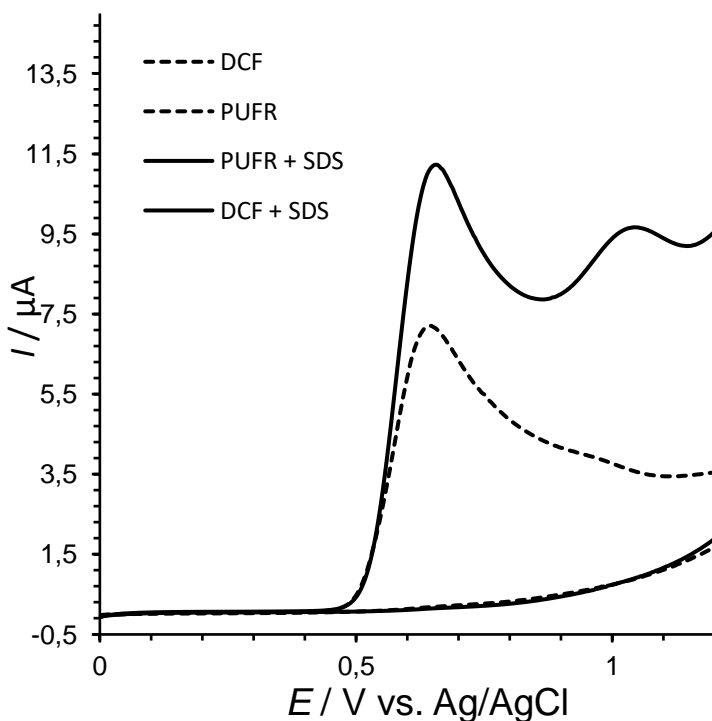
Experimentální podmínky: LSV; $v = 40 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; rozsah 0 až 1,7 V, 0,1 M PBS, $E_{\text{step}} = 2,5 \text{ mV}$; měřeno pro koncentraci $50 \mu\text{M}$ DCF, výsledná koncentrace tenzidu $50 \mu\text{M}$.

Vliv přidavku kationaktivního tenzidu Cetyltrimethylamonium-bromid (CTAB)



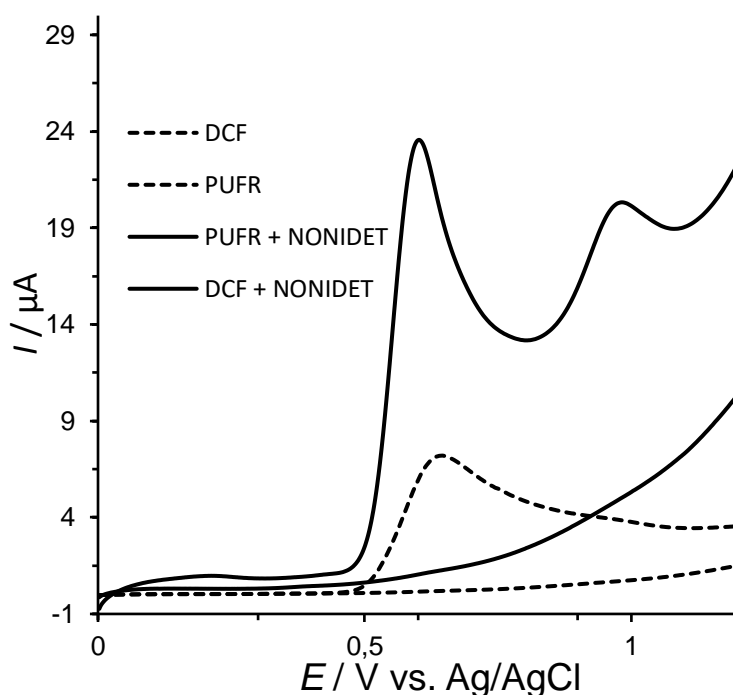
Obr. 27 – Porovnání odezvy pro 50 μM DCF bez a v přítomnosti CTAB. Experimentální podmínky: LSV; 0,1 M PBS pH = 7; $c_{(\text{DCF})} = 50 \mu\text{M}$; $c_{(\text{CTAB})} = 50 \mu\text{M}$; scan: 0 až 1,7 V vs. Ag/AgCl; $v = 40 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 2,5 \text{ mV}$.

Vliv přidavku anionaktivního tenzidu Dodecylsulfátu sodného (SDS)



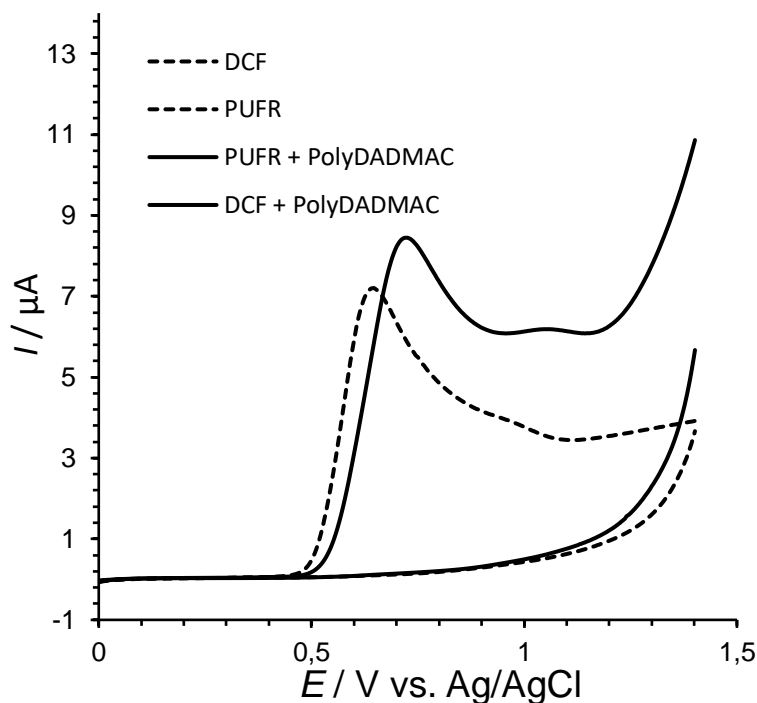
Obr. 28 – Porovnání odezvy pro 50 μM DCF bez a v přítomnosti SDS. Experimentální podmínky: LSV; 0,1 M PBS pH = 7; $c_{(\text{DCF})} = 50 \mu\text{M}$; $c_{(\text{CTAB})} = 50 \mu\text{M}$; scan: 0 až 1,7 V vs. Ag/AgCl; $v = 40 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 2,5 \text{ mV}$.

Vliv přidavku neionogenního tenzidu NONIDET



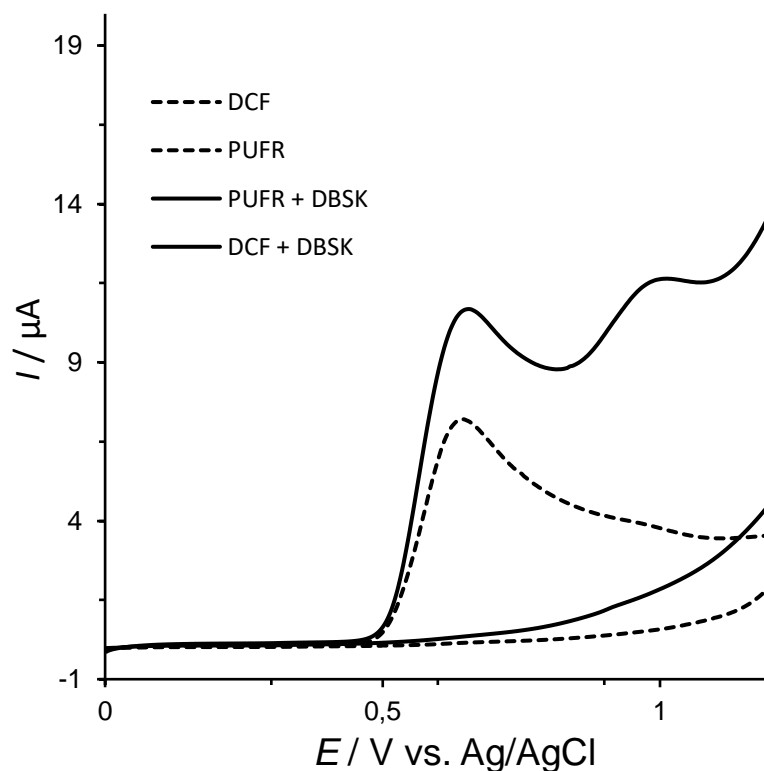
Obr. 29 – Porovnání odezvy pro $50 \mu\text{M}$ DCF bez a v přítomnosti NONIDET. Experimentální podmínky: LSV; $0,1 \text{ M}$ PBS $\text{pH} = 7$; $c_{(\text{DCF})} = 50 \mu\text{M}$; $c_{(\text{CTAB})} = 50 \mu\text{M}$; scan: 0 až $1,7 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl ; $v = 40 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 2,5 \text{ mV}$

Vliv přidavku kationaktivního tenzidu PolyDADMAC



Obr. 30 – Porovnání odezvy pro $50 \mu\text{M}$ DCF bez a v přítomnosti PolyDADMAC. Experimentální podmínky: LSV; $0,1 \text{ M}$ PBS $\text{pH} = 7$; $c_{(\text{DCF})} = 50 \mu\text{M}$; $c_{(\text{CTAB})} = 50 \mu\text{M}$; scan: 0 až $1,7 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl ; $v = 40 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 2,5 \text{ mV}$.

Vliv přidavku anionaktivního tenzidu Dodecylbenzensulfonové kyseliny (DBSK)



Obr. 31 – Porovnání odezvy pro 50 μM DCF bez a v přítomnosti DBSK. Experimentální podmínky: LSV; 0,1 M PBS pH = 7; $c_{(\text{DCF})} = 50 \mu\text{M}$; $c_{(\text{CTAB})} = 50 \mu\text{M}$; scan: 0 až 1,7 V vs. Ag/AgCl; $v = 40 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 2,5 \text{ mV}$.

Z daných měření je zřejmé, že největší vliv na odezvu měl přidavek kationaktivního CTAB, oproti záznamu v roztoku, kde byl přítomen pouze Diklofenak, se zvýšila odezva prakticky třikrát ($I_{\text{max}(\text{DCF})} = 7 \mu\text{A}$; $I_{\text{max}(\text{DCF}+\text{CTAB})} = 23 \mu\text{A}$). Podobný efekt by mohl vykazovat i neionogenní Nonidet, ale u něj zároveň se zvýšením prvního píku došlo k výraznému zvýšení i píku druhého, což nebylo žádoucí. Ostatní tři tenzidy nejevily tak výrazné zvýšení, tak jejich další využití nebylo vzato v úvahu.

6.2.6. Závislost odezvy na pH za přítomnosti CTAB

V popředí našeho zájmu zůstalo důkladné prozkoumání chování a působení CTAB na odezvy Diklofenaku. Logicky se tedy musel přeměřit i vliv složení základního elektrolytu, konkrétně tedy najít a potvrdit optimální pH k co nejpřesnější detekci.

Měření proběhlo v lineárním módu LSV pro tři koncentrace Diklofenaku - 500 μM ; 50 μM a 10 μM , výsledná koncentrace tenzidu byla v prvních dvou případech 50 μM , ve třetím 5 μM .

Experimentální podmínky:

První dvě série měření:

LSV - 0,1 M BRB, pH = 7; 7,5; 8; 8,5; 9; rozsah 0 až 1,1 V; $v = 40 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 2,5 \text{ mV}$; $c_{(\text{DCF})} = 500 \mu\text{M}$ resp. 50 μM ; $c_{(\text{CTAB})} = 50 \mu\text{M}$.

Třetí série měření:

LSV - 0,1 M BRB, pH = 7; 7,5; 8; 8,5; 9; rozsah 0 až 1,1 V; $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 2,5 \text{ mV}$; $c_{(\text{DCF})} = 10 \mu\text{M}$; $c_{(\text{CTAB})} = 5 \mu\text{M}$.

Tabulka 16 - LSV: Vliv pH na odezvu za přítomnosti CTAB pro 500 μM DCF

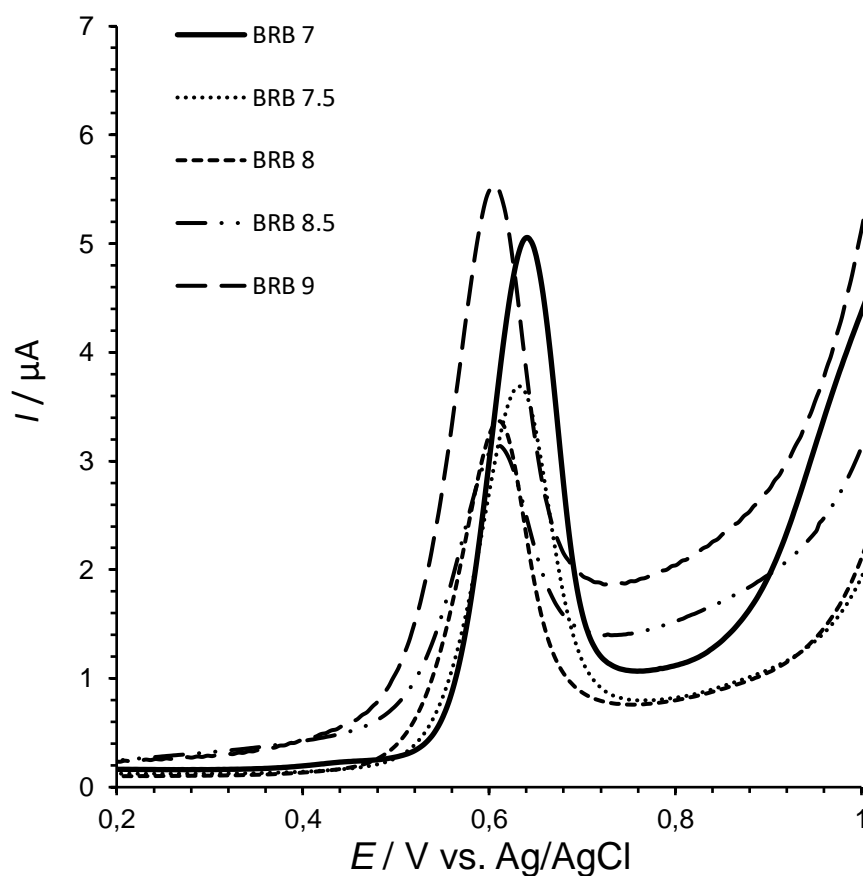
pH (BRB)	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	$x / \mu\text{A}$	σ	RSD %
7,0	0,623	15,586	0,623	15,326	0,639	14,596	15,169	0,382	2,520
7,5	0,599	16,100	0,598	17,960	0,608	17,676	17,245	0,764	4,428
8,0	0,576	20,780	0,564	19,587	0,569	22,377	20,915	0,975	4,661
8,5	0,557	24,208	0,549	20,917	0,554	24,979	23,368	1,634	6,992
9,0	0,532	19,425	0,542	22,038	0,537	18,538	20,000	1,358	6,792

Tabulka 17 - LSV: Vliv pH na odezvu za přítomnosti CTAB pro 50 μM DCF

pH (BRB)	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	$x / \mu\text{A}$	σ	RSD %
7,0	0,652	13,144	0,652	13,369	0,652	12,812	13,1083	0,19756	1,507099
7,5	0,632	15,396	0,632	16,027	0,632	15,865	15,7625	0,24433	1,550093
8,0	0,625	12,587	0,625	12,012	0,625	12,886	12,4951	0,32187	2,575943
8,5	0,613	13,645	0,602	13,002	0,613	13,865	13,504	0,33467	2,478278
9,0	0,601	15,259	0,608	14,279	0,611	15,706	15,0813	0,53489	3,546695

Tabulka 18 - LSV: Vliv pH na odezvu za přítomnosti CTAB pro 10 μM DCF

pH (BRB)	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	$x / \mu\text{A}$	σ	RSD %
7,0	0,642	4,282	0,642	4,429	0,640	4,389	4,367	0,057	1,296
7,5	0,632	3,688	0,625	3,501	0,623	4,084	3,758	0,217	5,786
8,0	0,623	2,869	0,618	3,355	0,610	2,906	3,043	0,208	6,822
8,5	0,593	2,521	0,615	2,155	0,608	2,173	2,283	0,159	6,945
9,0	0,613	4,560	0,605	4,292	0,610	4,235	4,362	0,132	3,020

**Obr. 32** – Prognání píků Diklofenaku v přítomnosti CTAB při různých pH.

Experimentální podmínky: LSV; 0,1 M BRB pH = 7; 7,5; 8; 8,5; 9; $c_{(\text{DCF})} = 10 \mu\text{M}$; $c_{(\text{CTAB})} = 5 \mu\text{M}$
scan: 0 až 1,1 V vs. Ag/AgCl; $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 2,5 \text{ mV}$.

Z provedených měření při všech koncentracích byly vždy znatelně nejmenší hodnoty RSD (2,5; 1,5 a 1,3 %) pro roztoky s pH = 7. U nejnižší koncentrace Diklofenaku byly i pro takové pH největší odezvy a nejlépe tvarované píky (viz obr. 32), což jen potvrdilo předchozí výsledky, že neutrální pH bylo možno považovat jako optimální.

6.2.7. Výběr základního elektrolytu / pufru při optimálním pH

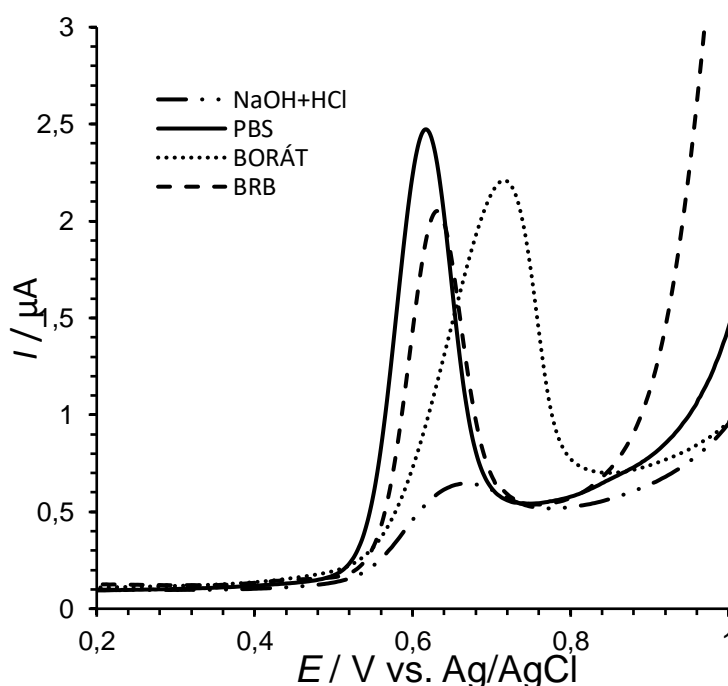
Kromě hodnoty pH základního elektrolytu je také nutné zjistit jeho optimální složení a jeho vliv na odezvu. Bylo tedy proměřeno několik médií, většinou pufrů, které bylo možno připravit, aby vykazovaly neutrální pH, jmenovitě: pufr fosfátový, Britton-Robinsonův, borátový a směsný pufr HCl + NaOH.

Podmínky optimalizace:

LSV – pH = 7; rozsah 0 až 1,1 V; $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 2,5 \text{ mV}$; $c_{(\text{DCF})} = 10 \text{ }\mu\text{M}$; $c_{(\text{CTAB})} = 50 \text{ }\mu\text{M}$.

Tabulka 19 - Odezvy pro různé typy pufrů v přítomnosti CTAB pro 10 μM DCF

pufr	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	$x / \mu\text{A}$	σ	RSD %
PBS	0,625	1,785	0,598	1,659	0,593	1,571	1,672	0,076	4,520
BRB	0,631	1,236	0,606	1,168	0,598	1,095	1,166	0,048	4,077
Borát	0,662	0,721	0,647	1,025	0,639	1,039	0,928	0,138	14,889
HCl+NaOH	0,654	0,315	0,688	0,537	0,688	0,623	0,492	0,118	23,955



Obr. 33 – Provnání piků různých druhů pufrů při optimálním pH. Experimentální podmínky: LSV; $c_{(\text{DCF})} = 10 \text{ }\mu\text{M}$; $c_{(\text{CTAB})} = 500 \text{ }\mu\text{M}$; scan: 0 až 1,1 V vs. Ag/AgCl; $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; 0,1 M PBS; 0,1 M BRB; 0,1 M Borátový pufr; 0,1 M NaOH+HCl.

Nejlépe vyvinuté odezvy s uspokojivou úrovní pozadí byly získány ve fosfátovém pufru, který byl zvolen jako optimální, už jen z důvodu menších nároků na přípravu a chemikálie.

6.2.8. Optimalizace koncentrace CTAB pro různé koncentrační úrovně

Diklofenaku

Další v řadě bylo nutné zjistit, jaká koncentrace tenzidu se jeví jako optimální pro různé koncentrační úrovně Diklofenaku. Vybrány byly tři různé koncentrace zásobního roztoku CTAB (1; 0,1 a 0,01 mM) pro tři různé úrovně DCF (5; 50 a 500 μM). Měření proběhla klasicky v lineárním módu LSV a poté i ve SWV.

Režim LSV

Podmínky optimalizace: LSV; 0,1 M PBS, pH = 7; rozsah 0 až 1,1 V; $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$, $E_{\text{step}} = 2,5 \text{ mV}$

Tabulka 20 - LSV: odezvy různých koncentrací DCF pro 50 μM CTAB

C_{DCF} (mol/l)	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	$x / \mu\text{A}$	σ	RSD %
5E-04	0,613	30,920	0,613	22,630	0,613	26,190	26,580	2,893	10,89
5E-05	0,627	17,303	0,627	17,109	0,627	19,593	18,002	1,061	5,89
5E-06	0,662	1,845	0,662	1,968	0,662	1,327	1,713	0,258	15,03

Tabulka 21 - LSV: odezvy různých koncentrací DCF pro 5 μM CTAB

C_{DCF} (mol/l)	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	$x / \mu\text{A}$	σ	RSD %
5E-04	0,654	11,064	0,654	11,391	0,654	11,192	11,216	0,117	1,04
5E-05	0,635	4,320	0,640	4,245	0,642	4,295	4,287	0,028	0,65
5E-06	0,673	1,790	0,669	1,734	0,675	1,706	1,743	0,031	1,78

Tabulka 22 - LSV: odezvy různých koncentrací DCF pro 0,5 μM CTAB

C_{DCF} (mol/l)	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	$x / \mu\text{A}$	σ	RSD %
5E-04	0,674	8,063	0,645	9,170	0,647	9,170	8,801	0,492	5,59
5E-05	0,598	1,586	0,601	1,651	0,591	1,615	1,617	0,022	1,39
5E-06	0,606	0,227	0,613	0,175	0,603	0,234	0,212	0,025	11,64

Režim SWV

Podmínky optimalizace: SWV; 0,1 M PBS, pH = 7; rozsah 0 až 1,4 V; amplituda 40 mV; f = 60 Hz; $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$.

Tabulka 23 - SWV: Odezvy různých koncentrací DCF pro 50 μM CTAB

C_{DCF} (mol/l)	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	$x / \mu\text{A}$	σ	RSD %
5E-04	0,645	66,460	0,635	68,930	0,640	74,006	69,799	2,805	4,02
5E-05	0,665	68,940	0,660	65,080	0,675	69,570	67,863	1,856	2,73
5E-06	0,690	17,850	0,694	21,620	0,694	19,580	19,683	1,291	6,56

Tabulka 24 - SWV: Odezvy různých koncentrací DCF pro 5 μM CTAB

C_{DCF} (mol/l)	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	$x / \mu\text{A}$	σ	RSD %
5E-04	0,628	38,240	0,623	36,500	0,628	38,650	37,797	0,864	2,29
5E-05	0,628	20,360	0,633	22,503	0,633	20,850	21,238	0,844	3,97
5E-06	0,653	9,753	0,645	10,170	0,653	10,330	10,084	0,221	2,19

Tabulka 25 - SWV: Odezvy různých koncentrací DCF pro 0,5 μM CTAB

C_{DCF} (mol/l)	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	$x / \mu\text{A}$	σ	RSD %
5E-04	0,630	24,720	0,624	24,090	0,642	24,100	24,303	0,278	1,14
5E-05	0,588	3,913	0,578	4,910	0,568	5,330	4,718	0,536	11,37
5E-06	0,583	0,711	0,583	0,906	0,587	0,719	0,779	0,085	10,90

U obou zvolených metod poskytl nejlepší výsledky přídavek 5 μM CTAB (zásobní roztok o $c = 0,1 \text{ mM}$), konkrétně pro všechny tři koncentrační úrovně hodnoty RSD od 0,6 do 3,9 %, ostatní koncentrace CTAB – tedy 50 μM a 0,5 μM měly odezvy s vysokými odchylkami a značně proměnné hodnoty výšek píku.

6.3. Analýza modelových vzorků / roztoků

6.3.1. Kalibrační závislosti v SWV módu

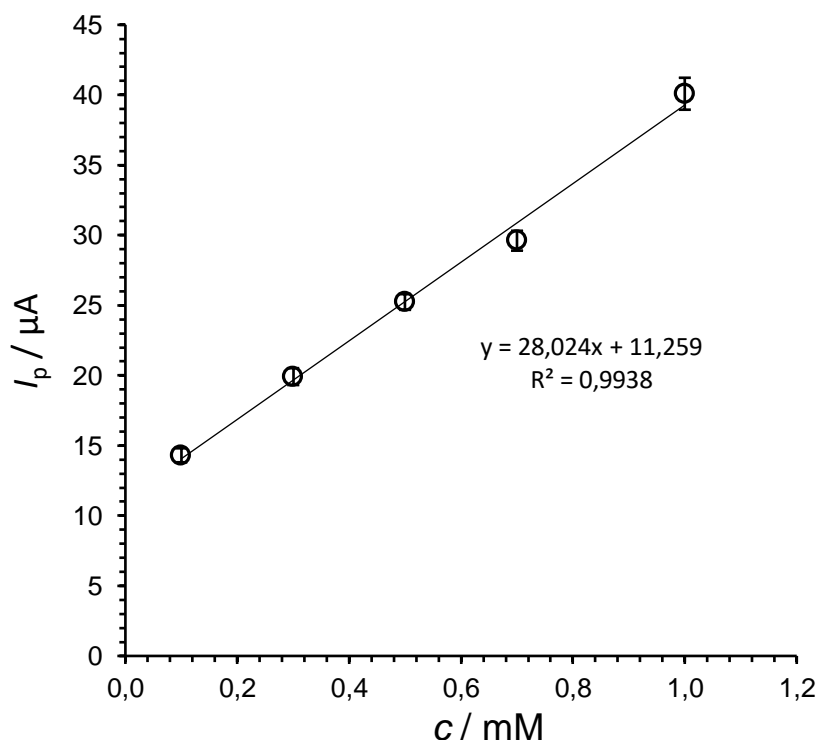
V optimalizovaném režimu SWV byla před testovacími měřeními reálných vzorků také potvrzena správnost vybraných parametrů na kalibračních řadách pro tři různé koncentrační úrovně Diklofenaku.

Kalibrační řada I. – 0,1 až 1 mM DCF

Parametry měření: SWV; 0,1 M PBS, pH = 7; rozsah 0 až 1,4 V; amplituda 40 mV; f = 60 Hz; $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$; $c_{\text{(CTAB)}} = 5 \text{ } \mu\text{M}$.

Tabulka 26 - SWV: Kalibrační řada I.

C_{DCF} (mM)	V_{DCF} (ml)	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	$x / \mu\text{A}$	σ	RSD %
0,1	0,10	0,643	13,560	0,653	14,996	0,638	14,366	14,307	0,498	3,482
0,3	0,30	0,583	20,819	0,613	19,322	0,588	19,612	19,918	0,601	3,017
0,5	0,50	0,587	25,116	0,608	26,077	0,587	24,525	25,239	0,558	2,213
0,7	0,70	0,567	28,826	0,623	30,668	0,559	29,326	29,607	0,708	2,390
1,0	1,00	0,618	40,503	0,613	38,380	0,613	41,380	40,088	1,138	2,840



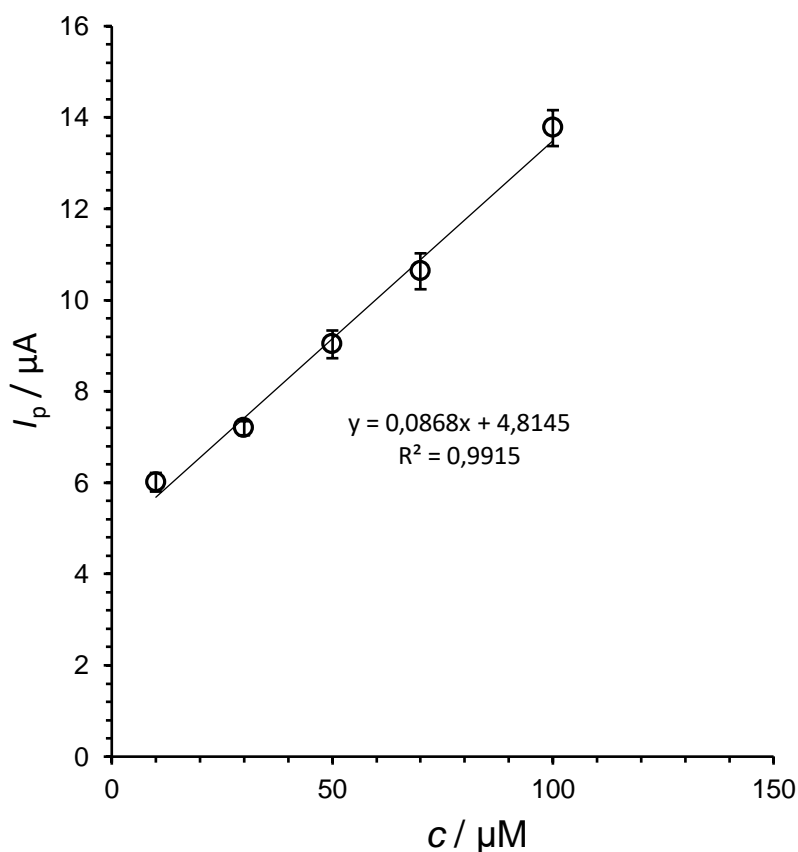
Obr. 34 – Kalibrační řada v koncentračním řádu 0,1 až 1 mM. Experimentální podmínky: SWV; 0,1 M PBS pH = 7; $c_{\text{(DCF)}} = 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1 \text{ mM}$; $c_{\text{(CTAB)}} = 5 \text{ } \mu\text{M}$; scan: 0 až 1,4 V vs. Ag/AgCl; amplituda 40 mV; f = 60 Hz; $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$.

Kalibrační řada II. – 10 až 100 μM DCF

Parametry měření: SWV; 0,1 M PBS, pH = 7; rozsah 0 až 1,4 V; amplituda 40 mV; f = 60 Hz; $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$; $c_{\text{(CTAB)}} = 5 \mu\text{M}$.

Tabulka 27 - SWV: Kalibrační řada II.

C_{DCF} (μM)	V_{DCF} (ml)	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	$x / \mu\text{A}$	σ	RSD %
10	0,01	0,603	6,2453	0,608	5,704	0,593	6,081	6,010	0,204	3,395
30	0,03	0,596	6,9873	0,603	7,425	0,603	7,1685	7,193	0,154	2,142
50	0,05	0,587	8,6556	0,568	9,424	0,589	9,0113	9,030	0,304	3,362
70	0,07	0,578	11,086	0,593	10,42	0,593	10,383	10,631	0,393	3,701
100	0,10	0,563	13,383	0,597	13,56	0,587	14,3569	13,767	0,393	2,858



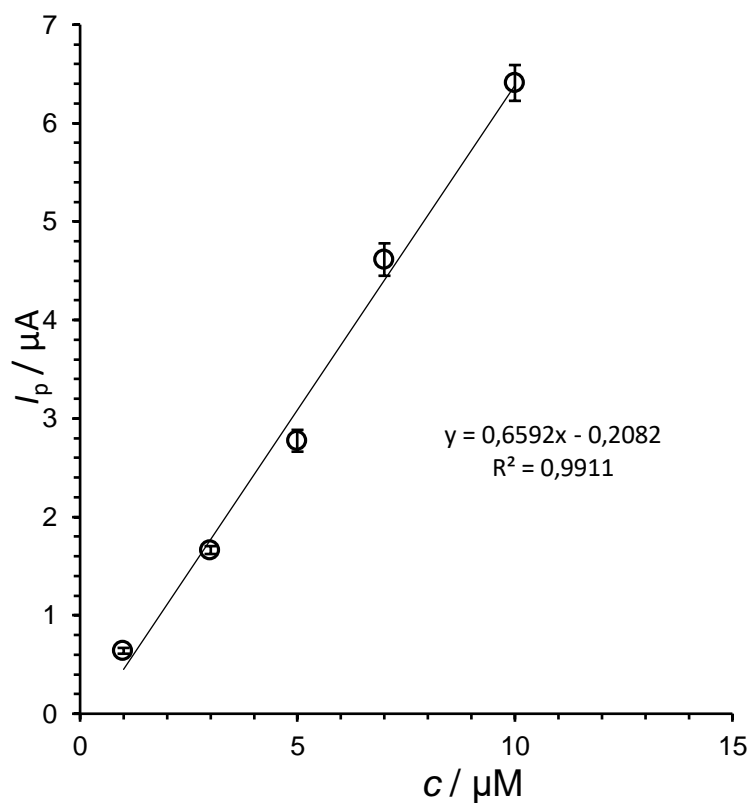
Obr. 35 – Kalibrační řada v koncentračním řádu 10 až 100 μM . Experimentální podmínky: SWV; 0,1 M PBS pH = 7; $c_{\text{(DCF)}} = 10; 30; 50; 70; 100 \mu\text{M}$; $c_{\text{(CTAB)}} = 5 \mu\text{M}$; scan: 0 až 1,4 V vs. Ag/AgCl; amplituda 40 mV; f = 60 Hz; $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$.

Kalibrační řada III. – 1 až 10 μM DCF

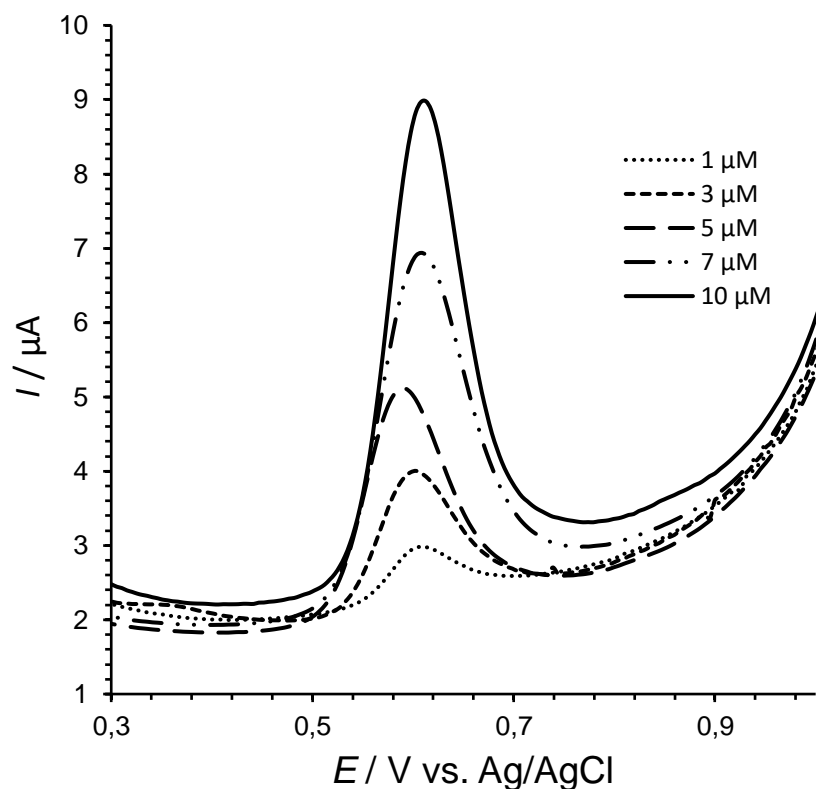
Parametry měření: SWV; 0,1 M PBS, pH = 7; rozsah 0 až 1,4 V; amplituda 40 mV; f = 60 Hz; $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$; $c_{\text{(CTAB)}} = 5 \mu\text{M}$.

Tabulka 28 – SWV: Kalibrační řada III.

C_{DCF} (μM)	V_{DCF} (ml)	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	$x / \mu\text{A}$	σ	RSD %
1	0,01	0,613	0,663	0,621	0,595	0,593	0,660	0,639	0,030	4,624
3	0,03	0,618	1,602	0,611	1,684	0,622	1,702	1,663	0,040	2,419
5	0,05	0,598	2,607	0,586	2,789	0,593	2,923	2,773	0,111	3,991
7	0,07	0,593	4,496	0,598	4,485	0,587	4,861	4,614	0,165	3,569
10	0,10	0,583	6,341	0,587	6,202	0,587	6,681	6,408	0,182	2,839



Obr. 36 – Kalibrační řada v koncentračním řádu 1 až 10 μM . Experimentální podmínky: SWV; 0,1 M PBS; pH = 7; $c_{\text{(DCF)}} = 1; 3; 5; 7; 10 \mu\text{M}$; $c_{\text{(CTAB)}} = 5 \mu\text{M}$; scan: 0 až 1,4 V vs. Ag/AgCl; amplituda 40 mV; f = 60 Hz; $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$.



Obr. 37 – Voltamogramy kalibrační řady 1 až 10 μM . Experimentální podmínky: SWV; 0,1 M PBS pH = 7; $c_{(\text{DCF})} = 10; 30; 50; 70; 100 \mu\text{M}$; $c_{(\text{CTAB})} = 5 \mu\text{M}$; scan: 0 až 1,4 V vs. Ag/AgCl; amplituda 40 mV; $f = 60 \text{ Hz}$; $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$.

Všechny tři koncentrační úrovně se zvolenou SWV modulací vykazovaly velmi přijatelné odchylky – vše pod $\pm 5 \%$. Ale u kalibrační řady I. a II., byl zaznamenán jistý trend, se zvyšující se odezvou pozadí, ačkoliv při proměření základního elektrolytu a základního elektrolytu s tenzidem nebyla zjevná žádná zvýšená odezva, ani žádný posun. Vysvětlení tohoto jevu není zcela jednoznačné, ale mohlo se jednat o začínající saturaci povrchu modifikované CPE při interakci s příliš vysokými koncentracemi analytu.

Tomu pak odpovídalo i zjištění, že nejlepší parametry kalibrace byly získány pro nejnižší studovanou koncentrační úroveň, čímž se zároveň potvrdila značná citlivost erodovaného povrchu uhlíkové pasty.

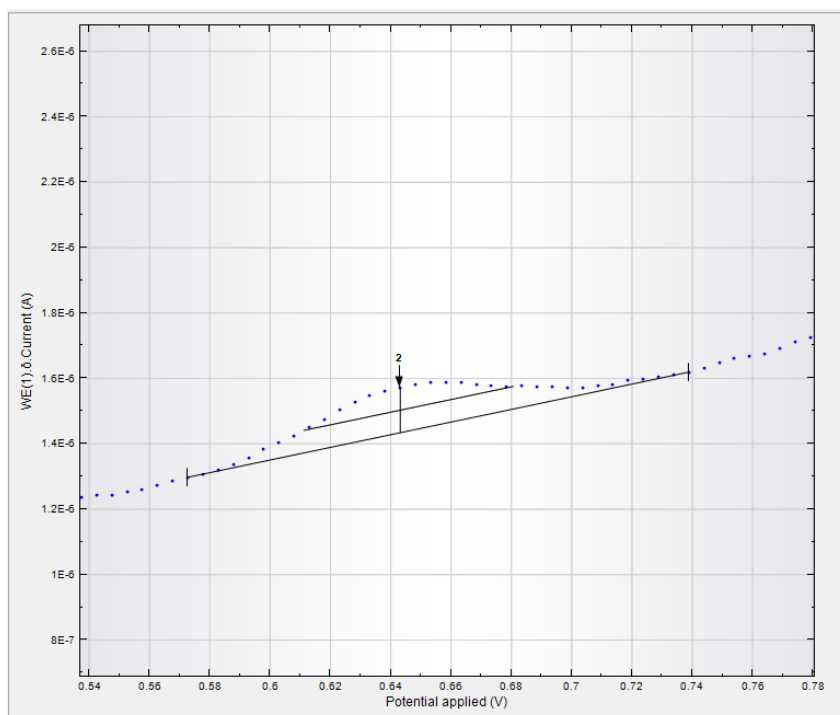
Pozn.: Praktickým důsledkem u následujících stanovení Diklofenaku v modelových vzorcích pak bylo, že analyzované vzorky bylo nutno ředit, aby měření neprobíhala na úrovni koncentrací při kalibracích II a III.

6.3.2. Mez detekce a mez stanovitelnosti

Důležitý parametr a ukazatel funkčnosti metody je také mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ). Metoda vyvinutá v rámci této diplomové práce a využívající ke stanovení DCF přídavek tenzidu měla limit detekce roven $5,3 \times 10^{-8} \text{ mol. L}^{-1}$ a mez stanovitelnosti $1,8 \times 10^{-7} \text{ mol. L}^{-1}$, což byly hodnoty více než uspokojivé.

Tabulka 29 - Mez detekce a stanovitelnosti

c mol. L ⁻¹	<i>I</i> _p / μA
	0,1346
	0,1294
1,468.10 ⁻⁷	0,1144
	0,0923
	0,1377
x / μA	σ
	0,1217
	0,0147
LOD	5,31E-08
LOQ	1,77E-07



Obr. 38 – Vyhodnocení píku pro LOD a LOQ (Obrázek z programu NOVA).

Experimentální podmínky: SWV; 0,1 M PBS pH = 7; $c_{(\text{DCF})} = 0,1468 \mu\text{M}$; $c_{(\text{CTAB})} = 5 \mu\text{M}$; scan: 0 až 1,4 V vs. Ag/AgCl; amplituda 40 mV; $f = 60 \text{ Hz}$; $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$.

6.3.3. Určení výtěžnosti stanovení

Pro pět vybraných modelových koncentrací Diklofenaku byly zjištěny následující výtěžnosti: 107,4; 94,7; 104,6; 97,0 a 92,0 %, z čehož průměrná hodnota činila 99,2 %. Již z těchto výsledků lze tedy říci, že tu nebyl patrný žádný trend, kdy by výsledky byly zatíženy systematickou chybou (s výtěžností „vedenou“ jedním směrem).

Experimentální podmínky: SWV; 0,1 M PBS pH = 7; $c_{(\text{CTAB})} = 5 \mu\text{M}$; scan: 0 až 1,4 V vs. Ag/AgCl; amplituda 40 mV; $f = 60 \text{ Hz}$; $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$.

Tabulka 30 - Určení výtěžnosti stanovení pro 5 různých koncentrací Diklofenaku

VZ 1	$I_p / \mu\text{A}$	VZ 2	$I_p / \mu\text{A}$	VZ 3	$I_p / \mu\text{A}$
OP1	2,327	OP1	3,846	OP1	2,940
OP2	2,233	OP2	3,940	OP2	4,630
OP3	2,112	OP3	3,340	OP3	2,896
teoret	2,078	teoret	3,326	teoret	3,326
$x / \mu\text{A}$	2,224	$x / \mu\text{A}$	3,709	$x / \mu\text{A}$	3,489
$c_{\text{sk}} (\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	6,980E-04	$c_{\text{sk}} (\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	1,468E-03	$c_{\text{sk}} (\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	1,075E-03
$c_{\text{exp}} (\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	7,499E-04	$c_{\text{exp}} (\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	1,391E-03	$c_{\text{exp}} (\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	1,124E-03
výtěžnost %	107,4	výtěžnost %	94,7	výtěžnost %	104,6

VZ 4	$I_p / \mu\text{A}$	VZ 5	$I_p / \mu\text{A}$
OP1	6,694	OP1	1,880
OP2	6,070	OP2	2,120
OP3	6,580	OP3	2,565
teoret	6,655	teoret	2,399
$x / \mu\text{A}$	6,448	$x / \mu\text{A}$	2,188
$c_{\text{sk}} (\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	2,081E-03	$c_{\text{sk}} (\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	7,950E-04
$c_{\text{exp}} (\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	2,018E-03	$c_{\text{exp}} (\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	7,314E-04
výtěžnost %	97,0	výtěžnost %	92,0

6.4. Stanovení Diklofenaku v reálných vzorcích

6.4.1. Analýza jednotlivých typů vzorků

Experimentální podmínky pro analýzu všech vzorků stejné:

SWV; 0,1 M PBS pH = 7; $c_{(\text{CTAB})} = 5 \mu\text{M}$; scan: 0 až 1,4 V vs. Ag/AgCl; amplituda 40 mV; $f = 60 \text{ Hz}$; $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$.

Tabulka 31 - Stanovení Diklofenaku ve vzorku 63BK1

63BK1	OP 1		OP 2		OP 3		x / μA	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$		
	0,668	4,640	0,668	3,990	0,668	4,340		

Tabulka 32 - Stanovení Diklofenaku ve vzorku 63BK2

63BK2	OP 1		OP 2		OP 3		x / μA	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$		
	0,678	2,680	0,683	2,090	0,678	1,950		

Tabulka 33 - Stanovení Diklofenaku ve vzorku 63BK3

63BK3	OP 1		OP 2		OP 3		x / μA	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$		
	0,683	1,940	0,683	1,916	0,678	1,240		

Tabulka 34 - Stanovení Diklofenaku ve vzorku 223BK1

223BK1	OP 1		OP 2		OP 3		x / μA	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$		
	0,663	3,010	0,668	3,260	0,668	2,750		

Tabulka 35 - Stanovení Diklofenaku ve vzorku 223BK2

223BK2	OP 1		OP 2		OP 3		x / μA	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$	E_p / V	$I_p / \mu\text{A}$		
	0,663	5,801	0,668	6,670	0,668	4,730		

Tabulka 36 - Stanovení Diklofenaku ve vzorku 223BK3

223BK3	OP 1		OP 2		OP 3		x / μ A	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A		
	0,678	1,740	0,678	2,210	0,668	1,360		

Tabulka 37 - Stanovení Diklofenaku ve vzorku 223BK4

223BK4	OP 1		OP 2		OP 3		x / μ A	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A		
	0,658	5,631	0,658	4,948	0,658	5,631		

Tabulka 38 - Stanovení Diklofenaku ve vzorku 2903BK1

2903BK1	OP 1		OP 2		OP 3		x / μ A	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A		
	0,678	2,108	0,683	1,662	0,678	1,351		

Tabulka 39 - Stanovení Diklofenaku ve vzorku 2603BK1

2603BK1	OP 1		OP 2		OP 3		x / μ A	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A		
	0,678	3,462	0,678	3,397	0,673	2,907		

Tabulka 40 - Stanovení Diklofenaku ve vzorku 44BK1

44BK1	OP 1		OP 2		OP 3		x / μ A	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A		
	0,678	1,900	0,678	2,845	0,678	2,472		

Tabulka 41 - Stanovení Diklofenaku ve vzorku 44BK2

44BK2	OP 1		OP 2		OP 3		x / μ A	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A		
	0,678	2,257	0,673	3,468	0,668	3,209		

Tabulka 42 - Stanovení Diklofenaku ve vzorku 44BK3

44BK3	OP 1		OP 2		OP 3		x / μ A	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A		
	0,673	2,881	0,663	2,440	0,673	3,150		

Tabulka 43 - Stanovení Diklofenaku ve vzorku 44BK4

44BK4	OP 1		OP 2		OP 3		x / μ A	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A		
	0,673	1,888	0,678	2,391	0,673	2,794		

Tabulka 44 - Stanovení Diklofenaku ve vzorku 104BK1

104BK1	OP 1		OP 2		OP 3		x / μ A	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A		
	0,673	2,498	0,668	2,271	0,678	2,265		

Tabulka 45 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 104BK2

104BK2	OP 1		OP 2		OP 3		x / μ A	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A		
	0,673	3,243	0,673	2,768	0,668	2,986		

Tabulka 46 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 104BK3

104BK3	OP 1		OP 2		OP 3		x / μ A	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A		
	0,668	1,789	0,663	1,557	0,668	1,687		

Tabulka 47 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 104BK4

104BK4	OP 1		OP 2		OP 3		x / μ A	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A	E_p / V	I_p / μ A		
	0,653	1,781	0,668	1,835	0,653	2,069		

Tabulka 48 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 104BK5

104BK5	OP 1		OP 2		OP 3		x / μA	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μA	E_p / V	I_p / μA	E_p / V	I_p / μA		
	0,653	2,002	0,668	1,835	0,658	1,963	1,933	6,54E-04

Tabulka 49 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 1104BK

1104BK	OP 1		OP 2		OP 3		x / μA	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μA	E_p / V	I_p / μA	E_p / V	I_p / μA		
	0,658	2,906	0,648	3,314	0,658	2,986	3,069	9,97E-04

Tabulka 50 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 1104BK6

1104BK6	OP 1		OP 2		OP 3		x / μA	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μA	E_p / V	I_p / μA	E_p / V	I_p / μA		
	0,658	3,966	0,658	4,229	0,648	4,168	4,121	1,32E-03

Tabulka 51 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 1204BK1

1204BK1	OP 1		OP 2		OP 3		x / μA	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μA	E_p / V	I_p / μA	E_p / V	I_p / μA		
	0,653	2,433	0,668	2,539	0,658	1,810	2,261	7,53E-04

Tabulka 52 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 1204BK2

1204BK2	OP 1		OP 2		OP 3		x / μA	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μA	E_p / V	I_p / μA	E_p / V	I_p / μA		
	0,653	1,399	0,658	1,792	0,655	1,496	1,562	5,42E-04

Tabulka 53 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 1204BK3

1204BK3	OP 1		OP 2		OP 3		x / μA	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μA	E_p / V	I_p / μA	E_p / V	I_p / μA		
	0,663	0,561	0,648	0,443	0,663	0,556	0,520	2,27E-04

Tabulka 54 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 1204BK4

1204BK4	OP 1		OP 2		OP 3		x / μA	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μA	E_p / V	I_p / μA	E_p / V	I_p / μA		
	0,653	2,487	0,648	2,342	0,658	2,268	2,366	7,85E-04

Tabulka 55 – Stanovení Diklofenaku ve vzorku 1204BK5

1204BK5	OP 1		OP 2		OP 3		x / μA	c / mol L ⁻¹
	E_p / V	I_p / μA	E_p / V	I_p / μA	E_p / V	I_p / μA		
	0,633	2,222	0,628	2,149	0,633	2,286	2,219	7,41E-04

6.4.2. Zhodnocení analýz reálných vzorků

Všechna měření vzorků proběhla v optimalizované metodě SWV s využitím přídatku 5 μM CTAB. Výsledné koncentrace odpovídaly očekávaným, resp. deklarovaným (dle podkladů od kolegů z ÚEnviCHI) a podle průběhu analýz, včetně samotných měření a celkového charakteru měřených signálů, bylo možno vyloučit negativní vlivy, které by vedly ke vzniku systematické odchylky či dokonce chyb jako takových.

Co se týče samotných vzorků, tak vyšší koncentrace jako např. u vzorků 1104BK a 1104BK6 které byly okolo $1,5 \times 10^{-3}$ mol. L⁻¹ Diklofenaku, svědčily o nepříliš vhodném využití granulovaného aktivního uhlí pro samotné odstraňování léčiva z vodných roztoků. Naopak koncentrace odpovídající hodnotám okolo 5×10^{-4} mol. L⁻¹, kde bylo využito biocharů (44BK1 až 44BK4) hovořily ve prospěch dalšího využívání tohoto progresivního a zároveň ekologického materiálu.

Nejlepší účinnost odstranění nakonec poskytlo aktivního uhlí v kombinaci s působením tenzidu. Příslušné analýzy se vzorkem 63BK2, který obsahoval (blíže nespécifikovaný) tenzid a reziduální koncentrace Diklofenaku byla stanovena na úrovni max. desítek mikromolů, konkrétně: $7,5 \times 10^{-5}$ mol. L⁻¹, což bylo výrazně méně než u předchozích dvou případů.

7. Závěr

Předložená diplomová práce přináší výsledky a pozorování z úvodní studie elektrochemického chování Diklofenaku a jeho možného stanovení ve vodných vzorcích ze životního prostředí. Toto téma zapadá do problematiky, kterou se již několik let zabývá skupina doc. Weidlicha z ÚEnviCHI na UPa. Jak je pro elektrochemickou skupinu na Fakultě chemicko-technologické UPa charakteristické, jako pracovní elektroda byla zvolena uhlíková pastová elektroda (CPE), jejíž náplň tvořila pastová směs tradičního složení (se silikonovým olejem jako pojivem).

Již v první fázi práce, při základní elektrochemické charakterizaci studii, se ukázalo, že výrazně lepší výkonnost měření zajistí chemická modifikace původní pasty. K tomuto účelu byly vyzkoušeny již mnohokrát osvědčené tenzidy, aplikované „*in situ*“, tzn. jako přídavek do měřeného roztoku (viz [3] a odkazy uvnitř). Z testovaných tenzidů se nakonec ukázal jako nejlepší zřejmě nejpoužívanější zástupce povrchově aktivních látek typu $R_3R'N^+$ známý pod zkratkou CTAB. Tomuto zjištění však předcházela samotná elektrochemická studie cílové látky, která byla provedena, jak s originální CPE, tak s modifikovanou variantou. Zjistilo se, že léčivo Diklofenak je elektrochemicky „vděčný“ analyt, neboť je vysoce elektroaktivní a jeho chování na CPE je velmi dobře reprodukovatelné s nadějnými vyhlídkami pro analytické účely.

Takové konstatování pak plně potvrdily i provedené experimenty, v neposlední řadě modelové kalibrace v několika koncentračních rozsazích, kdy bylo ověřeno, že interakce modifikovaného povrchu CPE s analytem je velmi citlivá a umožní detekovat sledovanou látku na úrovni 1×10^{-6} mol. L^{-1} (s mezí detekce až $5,3 \times 10^{-8}$ mol. L^{-1}). Naproti tomu bylo také ověřeno vcelku typické chování těchto modifikovaných past – a to, že není možné analyt měřit při příliš vysokých koncentracích (max. do 1×10^{-5} mol. L^{-1}), aby nedošlo k nežádoucímu zahlcení povrchu. Z toho vyplynulo, že při praktických zkouškách navržené metody je dobré alespoň přibližně znát obsah látky ve vzorku, aby ten se mohl případně naředit. Tomuto požadavku odpovídaly jak modelové roztoky, tak reálné vzorky z testování odstraňování reziduí a metabolitů léčiva s využitím vybraných fyzikálně-chemických pochodů.

Na samotný závěr lze konstatovat, že diskutovaná úvodní studie možného stanovení Diklofenaku ve znečištěných vodách splnila – a v některých aspektech i předčila – očekávání, což je slibné z pohledu dalšího pokračování výše zmíněné spolupráce na tématu, které se v současnosti dotýká všech, kdo se zajímá o aktuální stav životního prostředí.

8. Seznam použité literatury

- [1] Švancara I.: Využití pastové uhlíkové elektrody jako součásti funkčního vzorku polarografického analyzátoru určeného výhradně pro techniku rozpouštěcí voltametrie. Práce "SVOČ" (Studentská vědecká odborná činnost); Vysoká škola chemicko-technologická Pardubice, Pardubice (1987).
- [2] Švancara I., Kalcher K., Walcarius A., Vytřas K.: *Electroanalysis with Carbon Paste Electrodes*.(2012) *Taylor & Francis / CRC Press, Boca Raton (FL, USA)*
- [3] Švancara I., Metelka R., Mikysek T., Vytřas K.: 30 Years with Carbon Paste Electrodes at the University of Pardubice.(2017) *Sci. Pap. Univ. Pce, Ser. A* 23:5-50.
- [4] Küster Anette and Adler Nicole: Pharmaceuticals in the environment: Scientific evidence of risks and its regulation.(2014) *Philos.Trans. R. Soc. Lond., Ser. B, Biol. Sci.* 369(1656): 20130587.
- [5] Ivičková I.: i-Dnes, Hlavní zprávy; Chemie z léků znečišťuje světové řeky, jejich množství kriticky roste. https://zpravy.idnes.cz/znecesteni-voda-reka-povodi-zivotni-prostredi-ryby-leky-odpad-p7r-/zahranicni.aspx?c=A180411_100111_zahranicni_linv ; staženo dne 15.4.2018.
- [6] Lonappan L., Brar S. K., Das R. K., Verma M., Surampalli R. Y.: Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity-A review. *Environment international* (2016) 96: 127-138.
- [7] Müllerová Marie. *Léky*. 1. Olomouc: Rubico, 1999. ISBN 80-85839-30-X.
- [8] <http://www.olecich.cz/>
- [9] Tamura Y., Uenishi J., Choi H., Haruta J., Ischibashi H.: Synthesis of diclofenac. *Chemical and pharmaceutical bulletin* (1984) 32.5: 1995-1997.

- [10] Mei T.-S.; Wang D.-H.; Yu J.-Q. Expedient Drug Synthesis and diversification via ortho-C–H iodination using recyclable PdI₂ as the precatalyst. *Organic letters*, (2010) 12.14: 3140-3143.
- [11] <http://www.chemspider.com/>
- [12] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00586>
- [13] Saravanan M., Karthika S., Malarvizhi A., Ramesh M.: Ecotoxicological impacts of clofibric acid and diclofenac in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings: hematological, biochemical, ionoregulatory and enzymological responses. *Journal of hazardous materials* (2011) 195: 188-194.
- [14] Lonappan L., Brar S. K., Das R. K., Verma M., Surampalli R. Y.: Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity-A review. *Environment international* (2016) 96: 127-138.
- [15] Vogna D., Marotta R., Napolitano A., Andreozzi R., d'Ischia M.: Advanced oxidation of the pharmaceutical drug diclofenac with UV/H₂O₂ and ozone. *Water Research* (2004) 38.2: 414-422.
- [16] Beltrán F. J., Pocostales P., Alvarez P., Oropesa, A.: Diclofenac removal from water with ozone and activated carbon. *Journal of Hazardous Materials* (2009) 163.2: 768-776.
- [17] Macsek T. a kol. Removal of pharmaceuticals from drinking water matrix in a flow-through AOPs reactor. *CEST 15th* (2017)
- [18] Catrinescu C., Chelba A., Teodosiu C., Apopei P: Removal of Diclofenac from secondary wastewater effluents by Fenton based processes. *Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ)* (2017)16.4.
- [19] Bae S.; Kim D.; Lee W.: Degradation of diclofenac by pyrite catalyzed Fenton oxidation. *Applied Catalysis B: Environmental* (2013) 134: 93-102.

- [20] Zhao X., Hou Y., Liu H., Qiang Z., Qu, J.: Electro-oxidation of diclofenac at boron doped diamond: kinetics and mechanism. *Electrochimica Acta* (2009) 54.17: 4172-4179.
- [21] Dong H., Qiang Z., Lian J., Qu, J.: Promoted oxidation of diclofenac with ferrate (Fe (VI)): Role of ABTS as the electron shuttle. *Journal of Hazardous Materials* (2017) 336: 65-70.
- [22] Chang, E. E., Wan, J. C., Kim, H., Liang, C. H., Dai, Y. D., & Chiang, P. C.: Adsorption of selected pharmaceutical compounds onto activated carbon in dilute aqueous solutions exemplified by acetaminophen, diclofenac, and sulfamethoxazole. (2015) *The Scientific World Journal*, 2015.
- [23] Sotelo, J. L., Rodríguez, A., Álvarez, S., & García, J.: Removal of caffeine and diclofenac on activated carbon in fixed bed column. (2012) *Chemical Engineering Research and Design*, 90(7), 967-974.
- [24] Beltrán, F. J., Pocostales, P., Alvarez, P., & Oropesa, A.: Diclofenac removal from water with ozone and activated carbon. (2009) *Journal of Hazardous Materials*, 163(2-3), 768-776.
- [25] Bhadra, B. N., Seo, P. W., & Jhung, S. H.: Adsorption of diclofenac sodium from water using oxidized activated carbon. (2016) *Chemical Engineering Journal*, 301, 27-34.
- [26] Lonappan, L., Rouissi T., Brar S. K., Verma M., Surampalli R. Y.: Adsorption of diclofenac onto different biochar microparticles: Dataset–Characterization and dosage of biochar. (2018) *Data in brief*, 16, 460-465.
- [27] Matheson L. J.; Tratnyek P. G.: Reductive dehalogenation of chlorinated methanes by iron metal. *Environmental Science & Technology* (1994) 28.12: 2045-2053.
- [28] Ghauch A.; Assi H. A.; Bdeir S.: Aqueous removal of diclofenac by plated elemental iron: bimetallic systems. *Journal of Hazardous Materials* (2010) 182.1: 64-74.

- [29] Ghauch A., Assi H. A., Baydoun H., Tuqan A. M., Bejjani, A.: Fe 0-based trimetallic systems for the removal of aqueous diclofenac: Mechanism and kinetics. *Chemical engineering journal* (2011) 172.2: 1033-1044.
- [30] Hrdlička L.; Prousek J. Odstránenie liečiva Diklofenaku pomocou systému kovový hliník-kyselina. (2016) *9.konferencia odpadové vody 2016*
- [31] Arola K., Hatakka H., Mänttari M., Kallioinen M.: Novel process concept alternatives for improved removal of micropollutants in wastewater treatment. (2017) *Separation and Purification Technology*
- [32] Secondes M. F. N., Borea L., Naddeo V., Ballesteros F. C., Belgiorno V.: Combined application of membrane ultrafiltration, adsorption, and ultrasound irradiation for the removal of pharmaceutical compounds from real wastewater. (2017) *CEST 2017*
- [33] Sarasidis V. C.; Plakas K. V.; Karabelas A. J.: Novel water-purification hybrid processes involving in-situ regenerated activated carbon, membrane separation and advanced oxidation. (2017) *Chemical Engineering Journal* 328: 1153-1163.
- [34] Acero J. L., Benitez F. J., Real F. J., Teva F.: Removal of emerging contaminants from secondary effluents by micellar-enhanced ultrafiltration. (2017) *Separation and Purification Technology* 181: 123-131.
- [35] Vieno N.; Tuhkanen T.; Kronberg L. Removal of pharmaceuticals in drinking water treatment: effect of chemical coagulation. (2006) *Environmental Technology* 27.2: 183-192.
- [36] Caraballa M.; Omil F.; Lema J. M. Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment. (2005) *Water Research* 39.19: 4790-4796.
- [37] Roškar R., Kmetec V.: Liquid chromatographic determination of diclofenac in human synovial fluid. (2003) *Journal of Chromatography B* 788.1: 57-64.

- [38] Schmidt S., Hoffmann H., Garbe L. A., Schneider R. J.: Liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection of diclofenac and related compounds in water samples.(2018) *Journal of Chromatography A* 1538: 112-116.
- [39] Elzayat E. M., Ibrahim M. F., Abdel-Rahman A. A., Ahmed S. M., Alanazi F. K., Habib, W. A.: A validated stability-indicating UPLC method for determination of diclofenac sodium in its pure form and matrix formulations.(2017) *Arabian Journal of Chemistry* 10: S3245-S3254.
- [40] Roscher J.; Vogel M.; Karst U.. Identification of ultraviolet transformation products of diclofenac by means of liquid chromatography and mass spectrometry.(2016) *Journal of Chromatography A* 1457: 59-65.
- [41] <https://webbook.nist.gov/chemistry>
- [42] Yilmaz B.; Ciltas U.: Determination of diclofenac in pharmaceutical preparations by voltammetry and gas chromatography methods. (2015) *Journal of Pharmaceutical Analysis* 5.3: 153-160.
- [43] de Oliveira T., et al. Adsorption of diclofenac onto organoclays: Effects of surfactant and environmental (pH and temperature) conditions. (2017) *Journal of hazardous materials* 323: 558-566.
- [44] Tubino M.; de Souza R. L.: Determination of diclofenac in pharmaceutical preparations by diffuse reflectance photometry.(2006) *Talanta* 68.3: 776-780.
- [45] Arancibia J. A.; Boldrini M. A.; Escandar G. M.: Spectrofluorimetric determination of diclofenac in the presence of α -cyclodextrin.(2000) *Talanta* 52.2: 261-268.
- [46] Mauzrek S. Szostak R.: Quantitative determination of diclofenac sodium in solid dosage forms by FT-Raman spectroscopy.(2008) *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 48.3: 814-821.

- [47] Jin W.i; Zhang J.: Determination of diclofenac sodium by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. (2000) *Journal of Chromatography A*, 868.1: 101-107.
- [48] Malá Z.; Gebauer P.; Boček P.: Capillary isotachopheresis with ESI-MS detection: Methodology for highly sensitive analysis of ibuprofen and diclofenac in waters.(2016) *Analytica chimica acta* 907: 1-6.
- [49] Thongchai W., Liawruangrath B., Thongpoon C., Machan T.: High performance thin layer chromatographic method for the determination of diclofenac sodium in pharmaceutical formulations.(2006) *Chiang Mai J. Sci* 33.1: 123-128.
- [50] Cid-Cerón M. M., Guzmán-Hernández D. S., Ramírez-Silva M. T., Galano A., Romero-Romo M., Palomar-Pardavé M.: New insights on the kinetics and mechanism of the electrochemical oxidation of diclofenac in neutral aqueous medium. (2016) *Electrochimica Acta* 199: 92-98.
- [51] Aguilar-Lira G. Y., Álvarez-Romero G. A., Zamora-Suárez A., Palomar-Pardavé M., Rojas-Hernández A., Rodríguez-Ávila J. A., Páez-Hernández M. E.: New insights on diclofenac electrochemistry using graphite as working electrode (2017) *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2017, 794: 182-188
- [52] Shalauddin Md, Akhter S., Bagheri S., Karim M. S. A., Kadri N. A., Basirun W. J.: Immobilized copper ions on MWCNTS-Chitosan thin film: Enhanced amperometric sensor for electrochemical determination of diclofenac sodium in aqueous solution (2017) *International Journal of Hydrogen Energy* 42.31: 19951-19960.
- [53] Nguyen T. T. K., et al. Enzyme-less electrochemical displacement heterogeneous immunosensor for diclofenac detection. (2017) *Biosensors and Bioelectronics*, 97: 246-252.

- [54] Hu L., Zheng J., Zhao K., Deng A., Li, J.: An ultrasensitive electrochemiluminescent immunosensor based on graphene oxide coupled graphite-like carbon nitride and multiwalled carbon nanotubes-gold for the detection of diclofenac.(2018) *Biosensors and Bioelectronics*, 101: 260-267
- [55] Oliviera M. C., Bindewald E. H., Marcolino Jr L. H., Bergamini M. F.: Potentiometric determination of Diclofenac using an ion-selective electrode prepared from polypyrrole films. (2014) *Journal of Electroanalytical Chemistry* 732: 11-16.
- [56] Azadbakht A.; Beirnvand S.: Voltammetric aptamer-based switch probes for sensing diclofenac using a glassy carbon electrode modified with a composite prepared from gold nanoparticles, carbon nanotubes and amino-functionalized Fe₃O₄ nanoparticles. (2017) *Microchimica Acta* 184.8: 2825-2835.
- [57] Afkhami A.; Bahiraei A.; Madrakian T.: Gold nanoparticle/multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode as a sensitive voltammetric sensor for the determination of diclofenac sodium. (2016) *Materials Science and Engineering: C* 59: 168-176
- [58] Goodarzian M., Khalilzade M. A., Karimi F., Gupta V. K., Keyvanfard M., Bagheri H., Fouladgar M.: Square wave voltammetric determination of diclofenac in liquid phase using a novel ionic liquid multiwall carbon nanotubes paste electrode. (2014) *Journal of Molecular Liquids*, 197: 114-119.
- [59] Mokhtari A., Karimi-Maleh H., Ensafi A. A., Beitollahi H.: Application of modified multiwall carbon nanotubes paste electrode for simultaneous voltammetric determination of morphine and diclofenac in biological and pharmaceutical samples. (2012) *Sensors and Actuators B: Chemical*, 169: 96-105.
- [60] Mofidi Z., Norouzi P., Seidi S., Ganjali M. R.: Determination of diclofenac using electromembrane extraction coupled with stripping FFT continuous cyclic voltammetry. (2017) *Analytica chimica acta*, 972: 38-45.

- [61] Lenik J.: A new potentiometric electrode incorporating functionalized β -cyclodextrins for diclofenac determination. (2014) *Materials Science and Engineering: C*, 45: 109-116.
- [62] Yilmaz B., Kaban S., Akcay B. K., Ciltas U.: Differential pulse voltammetric determination of diclofenac in pharmaceutical preparations and human serum. (2015) *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51.2: 285-294.
- [63] Bard, A. J., Faulkner L. R.: Electrochemical methods. *Fundamentals and Applications*, (1980) 1st Edition. New York: John Wiley.
- [64] Gosser, D.K., Jr. (1993) The cyclic voltammetric experiment. In cyclic voltammetry: Simulation and analysis of reaction mechanisms, Chapter 2, pp. 27–69. New York: VCH Publishers
- [65] Scholz F. Ed. (2002) *Electroanalytical methods*. Berlin: Springer.
- [66] Kamenická B.: Využití kationaktivních tenzidů pro separaci chlorovaných biocidních kyselin a jejich solí z odpadních vod. (2018) *Diplomová práce*. Univerzita Pardubice
- [67] Atkins P., de Paula J.: *Atkins' Physical Chemistry*, 9th edition, Oxford University Press (2010) ISBN: 978-0-19-954337-3
- [68] Digua K., Kauffmann J. M., Delplancke J. L.: Surfactant modified carbon paste electrode: Part 1: Electrochemical and microscopic characterization. (1994) *Electroanalysis* 6(5-6), 451-458.

9. PŘÍLOHY

PŘÍLOHA I.

iDNES.cz

(vyšlo dne: 15. dubna 2018; 5:00)

Chemie z léků znečišťuje světové řeky, jejich množství kriticky roste...

☒ **Chemické látky z léčiv znečišťují říční systémy po celém světě. Pokud trend přetrvá, množství farmaceutického odpadu unikajícího do vodstva by se do roku 2050 mohlo zvýšit až o dvě třetiny, tvrdí nizozemští vědci.**



Obr.: *Uhynulá ryba na břehu řeky v čínském Wuhanu. Ilustrační foto*

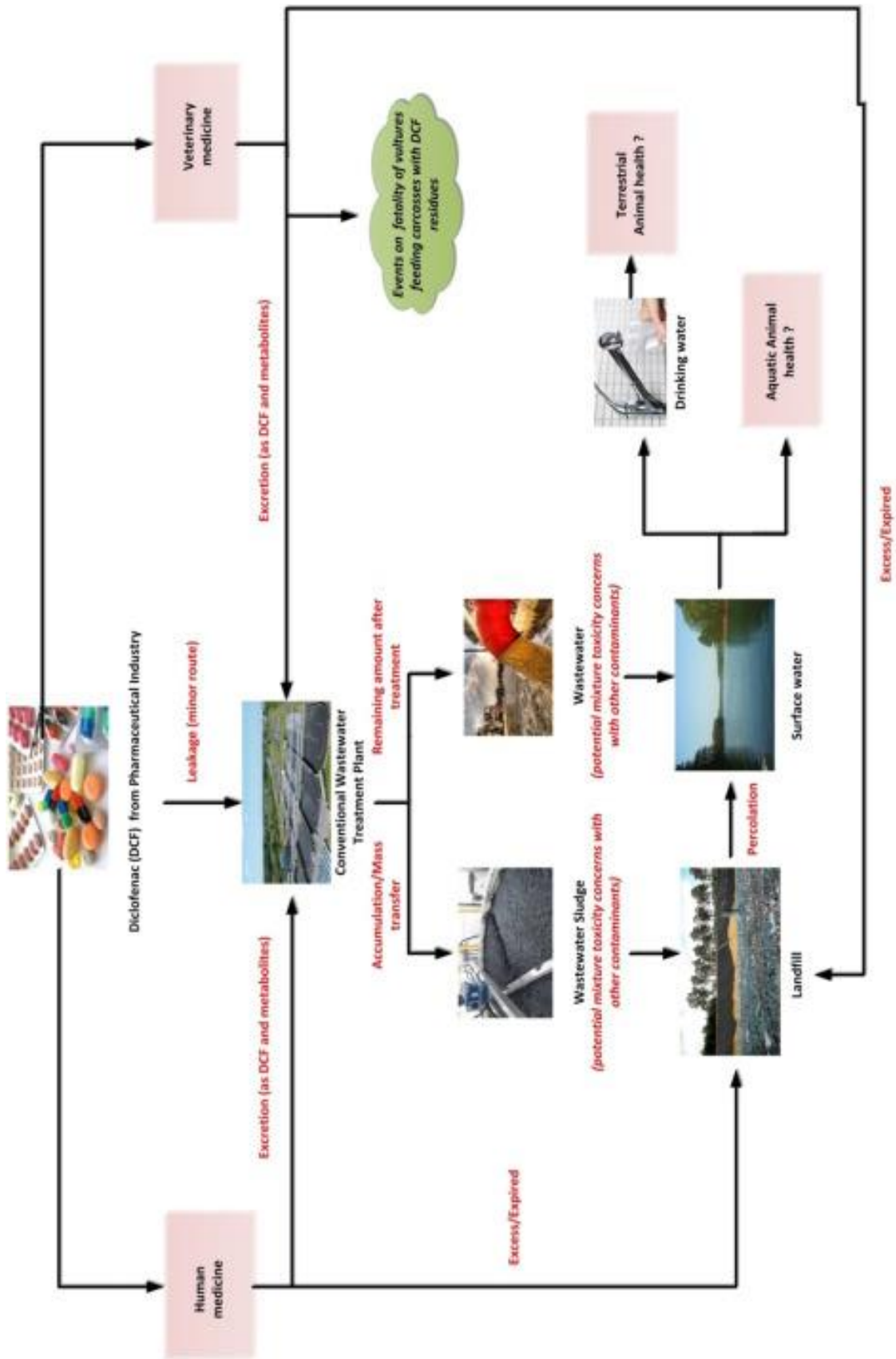
Podle vědců zbytky chemikálií z léčiv ve vodních systémech dosáhly kritické úrovně pro životní prostředí. „**Vysoké koncentrace léčiv potenciálně ohrožují mnoho sladkovodních ekosystémů,**“ uvedl na úterní konferenci Evropské unie pro geovědy ve Vídni *Francesco Bregoli* z nizo-zemského Institutu Delft pro vodní vzdělávání. Pokud nebudou přijata zmírňující opatření, vzroste podle vědců znečištění do roku 2050 o 65 %.

Pro svůj výzkum použili běžný protizánětlivý lék Diclofenac. „**Emise Diclofenacu jsou podobné tisícům jiných léčiv,**“ vysvětlil Bregoli výběr léku. Evropská unie a americká Agentura pro ochranu životního prostředí navíc lék označily za hrozbu pro životní prostředí. Jeho veterinární užití přivedlo třeba indický poddruh supů na pokraj vyhynutí. Světová spotřeba Diclofenacu nyní ročně přesáhne 2400 tun; je to např. skoro 25x více než před deseti lety. Několik set tun léku zůstane v lidském tělesném odpadu - čistírny z něj vyfiltrují zhruba 7 %, dalších 20 % absorbují ekosystémy. Zbytek chemikálií putuje dále do oceánů. Ve více než deseti tisících kilometrech světových řek tak koncentrace Diclofenacu přesáhla hranici stanovenou Evropskou unií, jak uvedla renomovaná společnost BBC.

Bregoli se svým týmem vyvinul počítačový model, pomocí kterého tým odhadl současné i budoucí znečištění chemikáliemi typu léčiv na základě míry zalidnění, odpadních systémů a prodeje léčiv. Výsledky pak vědci porovnali s daty nasbíranými na 1 400 stanicích měřicími toxicitu Diclofenacu. Většina měřicích stanic však byla v Evropě a Severní Americe. Úrovně chemického znečištění v Latinské Americe, Africe a Asii tak budou podle vědců ještě mnohem vyšší - některé ze zemí upravují méně než čtvrtinu vodního odpadu a technologie často neumí vyfiltrovat většinu chemikálií. Podle Bregoliho problém nedokáže vyřešit samotná technologie. „**Potřebujeme výrazně snížit spotřebu léků,**“ domnívá se. Vědci také zjistili, že úroveň říčního znečištění prudce zvýšilo i rozšíření kanalizačních systémů v urbanizovaných oblastech - velká část odpadů není náležitě ošetřována. „**Odpadní vody byly v roce 2000 zdrojem znečištění u zhruba poloviny řek na světě,**“ uvedla *Maryna Strokalová* z Univerzity ve Wageningenu. A dodala, že o deset let později už byly zdrojem znečištění téměř všech světových řek.

(-liv-)

PŘÍLOHA II.



Možné vstupní cesty DCF do prostředí (s původními popisky v angličtině)