

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Katedra analytické chemie

Voltametrické stanovení protizánětlivých léčiv meloxicamu
a lornoxicamu

DIPLOMOVÁ PRÁCA

AUTOR PRÁCE: Bc. Frederika Hlobeňová

VEDÚCI PRÁCE: doc. Ing. Renáta Šelešovská, Ph.D.

KONZULTANT PRÁCE: Ing. Marie Herynková

2019

UNIVERSITY OF PARDUBICE

FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

Department of Analytical Chemistry

Voltammetric determination of anti-inflammatory drugs meloxicam
and lornoxicam

DIPLOMA THESIS

AUTHOR: Bc. Frederika Hlobeňová

SUPERVISOR: doc. Ing. Renáta Šelešovská, Ph.D.

CONSULTANT: Ing. Marie Herynková

2019

ZADANIE DIPLOMOVEJ PRÁCE

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Frederika Hlobeňová**
Osobní číslo: **C17421**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Voltametrické stanovení protizánětlivých léčiv meloxicamu a lornoxicamu**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

Teoretická část:

Popište stručně princip voltametrie a uveďte přehled základních voltametrických metod používaných v elektroanalytické chemii.

Zpracujte literární rešerši týkající se protizánětlivých léčiv ze skupiny oxicamů, konkrétně meloxicamu a lornoxicamu. Zaměřte se na problematiku jejich voltametrického chování, resp. možností stanovení s využitím různých pracovních elektrod.

Experimentální část:

V rámci experimentální části prostudujte voltametrické chování meloxicamu a lornoxicamu na borem dopované diamantové elektrodě a navrhnete mechanismus oxidace těchto látek.

Navrhnete podmínky stanovení léčiv v modelových roztocích. Vyvinuté metody aplikujte při analýze praktických vzorků.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Renáta Šelešovská, Ph.D.**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství
Konzultant diplomové práce: **Ing. Marie Herynková**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství
Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prehlasujem:

Túto prácu som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci využila, sú uvedené v zozname použitej literatúry.

Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č 121/2000 Sb, o práve autorskom, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon), v znení neskorších predpisov, hlavne so skutočnosťou, že Univerzita Pardubice má právo na uzatvorenie licenčnej zmluvy o použití tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst.1 autorského zákona, a s tým, že pokiaľ dôjde k použitiu tejto práce mnou alebo bude poskytnutá licencia na použitie inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená odo mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorenie diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Beriem na vedomie, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o zmene a doplnení ďalších zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších predpisov, a smernici Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pre zverejňovanie záverečných prác a ich základnú jednotnú formálnu úpravu, v znení neskorších dodatkov, bude práca zverejnená v Univerzitnej knižnici a prostredníctvom Digitálnej knižnice Univerzity Pardubice.

Súhlasím s prezenčným sprístupnením svojej práce v Univerzitnej knižnici.

V Pardubiciach dňa 1. 5. 2019

.....

Frederika Hlobeňová

Pod'akovanie

V prvom rade by som sa veľmi rada poďakovala vedúcej mojej diplomovej práce doc. Ing. Renáte Šelešovské, Ph.D. a konzultantke Ing. Marii Herynkové za veľkú pomoc, trpezlivosť, užitočné pripomienky a odborné rady. Krstným rodičom, starým rodičom ale hlavne mojej úžasnej mame Anetke a najlepšej sestre Scarlett, ktoré vždy stáli pri mne, verili mi, podporovali ma v ťažkých chvíľach a vždy tu pre mňa boli. V neposlednom rade nesmiem zabudnúť a poďakovať mojej najbližšej kamarátke Monike za jej psychickú podporu počas celého môjho univerzitného študentského boja.

ANOTÁCIA

Cieľom tejto diplomovej práce bolo štúdium voltampérometrického správania dvoch liečiv zo skupiny oxikámov, a to meloxicámu a lornoxicámu, na bórom dopovanej diamantovej elektróde. Následne boli vyvinuté metódy stanovenia obidvoch analytov, ktoré boli otestované pri analýze modelových roztokov. Na záver boli navrhnuté metódy úspešne aplikované pri analýze farmaceutických prípravkov vo forme tabliet.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

voltampérometria, bórom dopovaná diamantová elektróda, meloxicám, lornoxicám

ANNOTATION

The aim of this thesis was to study a voltammetric behavior of two drugs from oxicam group, namely meloxicam and lornoxicam, on a boron doped diamond electrode. Subsequently, new methods for both analytes determination were developed and verified by model solutions analysis. Finally, the proposed methods were successfully applied for analysis of pharmaceutical preparations in tablet forms.

KEY WORDS

voltammetry, boron doped diamond electrode, meloxicam, lornoxicam

OBSAH

Úvod.....	12
1. Teoretická časť.....	14
1.1. Inštrumentálna analýza.....	14
1.2. Voltampérometria	15
1.2.1. Úvod do voltampérometrických metód	16
1.2.2. Inštrumentácia.....	18
1.2.3. Pracovné elektródy vo voltampérometrií /polarografií.....	22
1.2.4. Polarografické/voltampérometrické krivky	25
1.2.5. Voltampérometrické metódy	28
1.2.6. Bórom dopovaná diamantová elektróda	31
1.3. Oxikámy.....	32
1.3.1. Meloxikám.....	33
1.3.2. Lornoxikám.....	36
2. Experimentálna časť	40
2.1. Prístrojové vybavenie.....	40
2.2. Použité chemikálie	41
2.3. Procedúry	41
2.3.1. Príprava BDDE k meraniu	41
2.3.2. Voltampérometrické merania	42
2.3.3. Analýza farmaceutického prípravku	42
3. Výsledky a diskusia	44
3.1. Voltampérometrické správanie meloxikámu a lornoxikámu	44
3.1.1. Závislosť na pH.....	46
3.1.2. Závislosť na rýchlosti polarizácie	48
3.2. Vývoj metód voltampérometrického stanovenia MLX a LRX.....	52

3.2.1	Optimalizácia parametrov diferenčne pulznej voltampérometrie.....	52
3.2.2	Analýza modelových roztokov	59
3.2.3	Analýza farmaceutických prípravkov	63
4	Záver	67
	Zoznam použitej literatúry	69

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

α	koeficient prenosu náboja
a	aktivita oxidovanej alebo redukovanej formy
AdS SWV	adsorpčná rozpúšťacia square wave voltampérometria
AdSV	adsorpčná rozpúšťacia voltampérometria
Ag/AgCl	argentchloridová elektróda
AgSAE	strieborná pevná amalgámová elektróda
ASV	anodická rozpúšťacia voltampérometria
BDD	bórom dopovaný diamant
BDDE	bórom dopovaná diamantová elektróda
BiFE	bizmutová filmová elektróda
BRB	Brittonov-Robinsonov pufor
c	koncentrácia [mol L^{-1}]
COX-1	cyklooxygenáza-1
COX-2	cyklooxygenáza-2
CPE	uhlíková pastová elektróda
CSV	katodická rozpúšťacia voltampérometria
CV	cyklická voltampérometria
DCV	rovnosmerná voltampérometria
DME	kvapkajúca ortuťová elektróda
DPP	diferenčne pulzná polarografia
DTA	diferenčne termická analýza
e^-	voľný radikál
E	elektrický potenciál elektródy
E^0	štandardný potenciál elektródy
$E_{1/2}$	polvlnový potenciál [V]
E_a	potenciál anódy
E_k	potenciál katódy
E_{kon}	konečný potenciál [V]
E_{obratu}	potenciál obratu [V]
E_p	poloha výsledných pík
$E_{\text{poč}}$	počiatočný potenciál [V]
F	Faradayova konštanta [$9,6485 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$]

GCE	elektroda zo skleneného uhlíku
HMDE	visiaca ortuťová kvapková elektroda
I	prúd [A]
I_{lim}	limitný prúd
I_p	výška píku [A]
k^0	heterogénna rýchlostná konštanta [cm s^{-1}]
LOD	limit detekcie
LOQ	medza stanoviteľnosti
LRX	lornoxikám
m	prietoková rýchlosť
MFE	ortuťová elektroda
MIP	molecular imprinted polymer
MLX	meloxikám
MetOH	metanol
n	počet vymenených elektrónov
NMR	nukleárna magnetická rezonančná spektroskopia
NSA	nesteroidné antiflogistiká
NSAID	nesteroidný protizápalový liek oxikámových derivátov
Ox	oxidovaná forma
P	polarizačné napätie [V]
R	plynová konštanta
R	odpor
Red	redukovaná forma
SHE	štandardná vodíková elektroda
SKE	saturovaná kalomelová elektroda
SMDE	statická ortuťová kvapková
t	doba kvapky
T	teplota v kelvinoch
TGA	termogravimetrická analýza
UV	ultrafialové žiarenie
U_v	vložené napätie [V]
v	rýchlosť polarizácie [V s^{-1}]
V	objem [L]

Úvod

Nesteroidné antireumatiká (NSA) meloxicám a lornoxicám patriace do skupiny oxikámov sú určené na krátkodobú liečbu pacientov s akútnou miernou až stredne silnou bolesťou a príznakmi reumatoidnej osteoartritídy ako bolesť a zápal kĺbov. Oba spomínané oxikámy vynikajú predovšetkým veľmi rýchlym nástupom účinku, dobrou znášanlivosťou a vyváženým pomerom inhibície oboch izoforiem cyklooxygenázy. Liečba meloxicámom aj lornoxicámom by mala byť dôkladnejšie sledovaná, najmä u detí a gravidných žien, s ohľadom k nedostačujúcim údajom o ich účinku. Vďaka rýchlej a pokročilej dobe chémie a medicíny sa vedecké tímy neustále snažia o inovácie pre zlepšenie zdravia človeka. Novinky v oblasti liečby bolesti zasahujú ako do oblasti nových účinných látok, tak aj do oblasti nových liekových foriem, rozšírenia indikácií a nových stratégií v liečbe rôznych typov bolesti. Novinky, s ktorými sa už môžeme stretnúť, sú predovšetkým nové topické formy liekov na liečbu periférnej neuropatickej bolesti. V súvislosti s rýchlym vývojom v oblasti medicíny je rovnako potrebné mať k dispozícii nástroje, umožňujúce monitorovanie presného zloženia farmaceutických prípravkov a kontrolu obsahu účinných látok v dostupných liekových formách deklarovaného výrobcom. V súčasnosti rovnako dochádza celosvetovo k nárastu užívania, resp. nadužívaniu liekov, čo taktiež vedie ku kontaminácii vôd a preto je ich kvalitu nutné sledovať.

Výbornou vlastnosťou meloxicámu aj lornoxicámu je ich elektrochemická aktivita, vďaka čomu je možné ich stanovenie, vedľa široko rozšírených chromatografických metód, aj s využitím voltampérometrickej analýzy. Tá môže slúžiť ako veľmi rýchla, jednoduchá a lacná doplnková metóda s veľmi nízkymi limitmi detekcie. V minulosti bola polarografia, resp. voltampérometria neodmysliteľne spojená s ortuťovými elektródami. V súčasnosti je ale používanie ortuti ako elektródového materiálu obmedzované vzhľadom k rizikám spojeným s toxicitou hlavne ich pár a orgánokovových zlúčenín. Významným trendom v oblasti elektroanalytickej chémie je preto vývoj nových elektródových materiálov. Medzi perspektívne elektródové materiály patrí bezpochyby bórom dopovaný diamant. Tieto elektródy boli doposiaľ používané pri stanovení celého radu organických látok hlavne vďaka širokému využiteľnému potenciálovému rozsahu.

Cieľom mojej diplomovej práce bolo štúdium voltampérometrického správania liečiv meloxicámu a lornoxicámu a vývoj voltampérometrickej metódy ich stanovenia s využitím bórom dopovanej diamantovej elektródy.

1. Teoretická časť

1.1. Inštrumentálna analýza

Inštrumentálna analýza je určitým medzistupňom medzi chemickou analýzou a automatickou analytickou kontrolou. Na princípoch inštrumentálnej analýzy sú konštruované zariadenia, ktoré pracujú bez zásahu človeka (automatické analyzátory). Ich signál môžeme využiť k riadeniu a optimalizácii technologických procesov [1].

Inštrumentálna analýza nie je homogénny obor, preto sa delí do menších celkov podľa povahy princípov, na ktorých sú jednotlivé inštrumentálne analytické metódy založené. Rozdelenie je znázornené v tab. 1. Medzi inštrumentálne metódy sú niekedy zaradené aj niektoré separačné metódy (napr. chromatografia), ktoré môžu súčasne plniť aj analytickú funkciu [1].

Tabuľka 1 Rozdelenie inštrumentálnych metód [1]

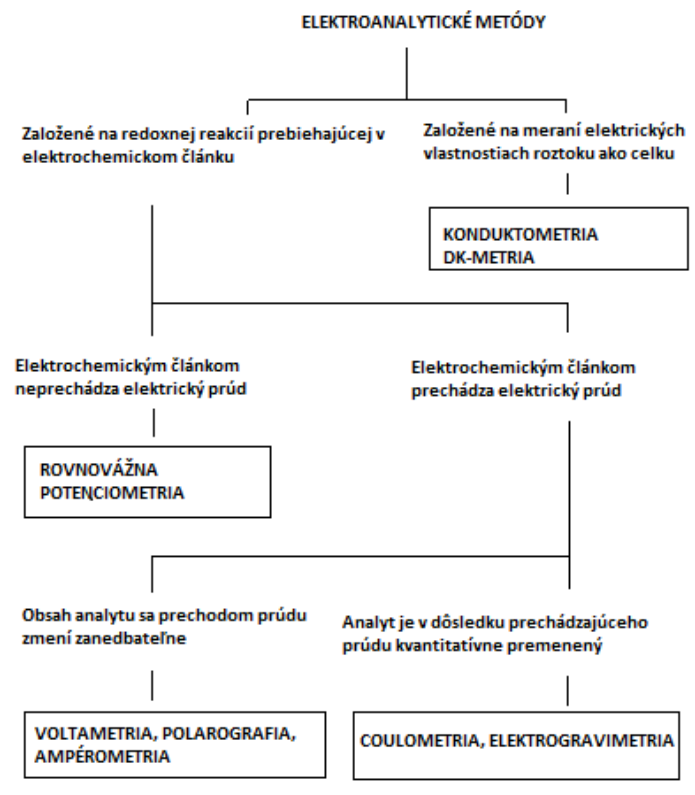
Princíp	Skupina metód	Príklady použitia
Prenos elektrického náboja cez fázové rozhranie roztok – tuhá látka a transport nabitých častíc v roztoku.	Elektroanalytické metódy	Potenciometria Konduktometria Dielektrimetria Polarografia a voltampérometria Coulometria Elektrogravimetria
Interakcie elektromagnetického žiarenia a vzorky alebo vzorka ako zdroj elektromagnetického žiarenia.	Optické metódy	Emisné metódy Absorpčné metódy Refraktometria Interferometria Polarimetria Rádiometria NMR
Pochody pri zahrievaní alebo ochladzovaní tuhých a kvapalných vzoriek.	Termická analýza	DTA TGA Termická dilatometria Entalpiometria

NMR- Nukleárna magnetická rezonančná spektroskopia, DTA – diferenčná termická analýza, TGA – termogravimetrická analýza

1.2. Voltampérometria

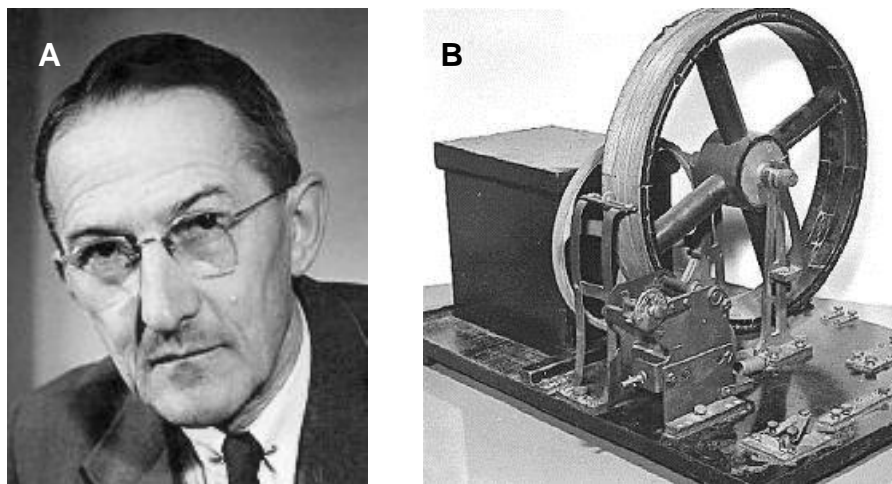
Voltampérometria je elektrochemická metóda, pri ktorej sa sleduje závislosť prúdu prechádzajúceho analyzovaným roztokom na potenciáli, ktorý je z vonka vkladajú na pracovnú elektródu. Závislosť prúdu na elektródovom potenciáli je možné merať v ustálenom stave alebo za nestacionárnych podmienok [2].

Meranie elektrického napätia (potenciálu) využíva potenciometria, elektrický prúd je meraný polarografiou a voltampérometriou, v konduktometrii meriame elektrickú vodivosť roztoku, v dielektrimetri relatívnu permitivitu a coulometria je založená na meraní elektrického náboja. Zvláštne postavenie má elektrogravimetria, ktorá síce využíva elektrický prúd k vylučovaniu látok elektrolýzou, ale ich množstvo sa stanovuje vážením. Metódy založené na redoxnej reakcii sa označujú ako elektrochemické, zatiaľ čo o metódach založených na meraní určitej elektrickej vlastnosti roztoku ako celku hovoríme ako o elektrometrických [3]. Podstatou elektrogravimetrie, coulometrie a polarografie je elektrolýza, preto sa uvedené elektrochemické metódy súhrnne označujú ako metódy elektrolytické [1]. Podrobnejšia schéma členenia elektroanalytických metód je uvedená na obrázku 1.



Obrázok 1 Schéma rozdelenia elektroanalytických metód [4]

Polarografiu objavil v roku 1922 Jaroslav Heyrovský (obr. 2A). Pre urýchlenie zaznamenávania hodnôt sa spojil s japonským vedcom Masuzo Shikatu a skonštruovali spolu polarograf (obr. 2B), ktorý automaticky zaznamenával polarizačné krivky. Za objav polarografie a rozpracovanie tejto analytickej metódy v roku 1959, kedy bol nominovaný už osemnásťkrát, získal Heyrovský Nobelovu cenu za chémiu.



Obrázok 2 Jaroslav Heyrovský (A) a prvý polarograf (B) [5]

1.2.1. Úvod do voltampérometrických metód

Voltampérometria a polarografia sú metódy, pri ktorých sledujeme závislosť prúdu prechádzajúceho pracovnou elektródou ponorenou v analyzovanom roztoku na potenciáli, ktorý sa na túto elektródu vkladá z vonkajšieho zdroja. Výsledkom tejto závislosti je polarizačná krivka (polarogram, voltampérogram), z ktorej potom určujeme druh a obsah analytu (inak nazývaného depolarizátor alebo elektroaktívna látka) [6]. Prúdová odozva je založená na elektródovom deji, čo je zvyčajne oxidačno-redukčná reakcia, ktorá prebieha na elektródach a môžeme ju vyjadriť rovnicou (1):



pričom n je počet vymenených elektrónov [6]. Voltampérometrické metódy boli odvodené od pôvodnej polarografie. Tá vo svojej najjednoduchšej forme znamená skúmanie roztokov systémom dvoch elektród, jednej polarizovateľnej a jednej nepolarizovateľnej, z ktorých prvá je tvorená kvapkajúcou ortuťou [6]. Voltampérometrické metódy využívajú stacionárne pracovné elektródy, konkrétne visiacu ortuťovú kvapkovú elektródu alebo elektródy z pevných materiálov.

Pri meraní sa potenciál pracovnej elektródy mení s časom podľa určitej funkcie (pri jednosmernej voltampérometrii alebo polarografii ide o lineárnu zmenu potenciálu s časom). Elektróda ponorená do roztoku elektroaktívnej látky s istými aktivitami oxidovanej a redukovanej formy nadobúda bez dodávania práce zvonka rovnovážny potenciál, definovaný (v súlade s konvenciou ako redukčný potenciál) Nernstovou-Petersovou rovnicou (2) [7]:

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{red}}{a_{ox}} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}}, \quad (2)$$

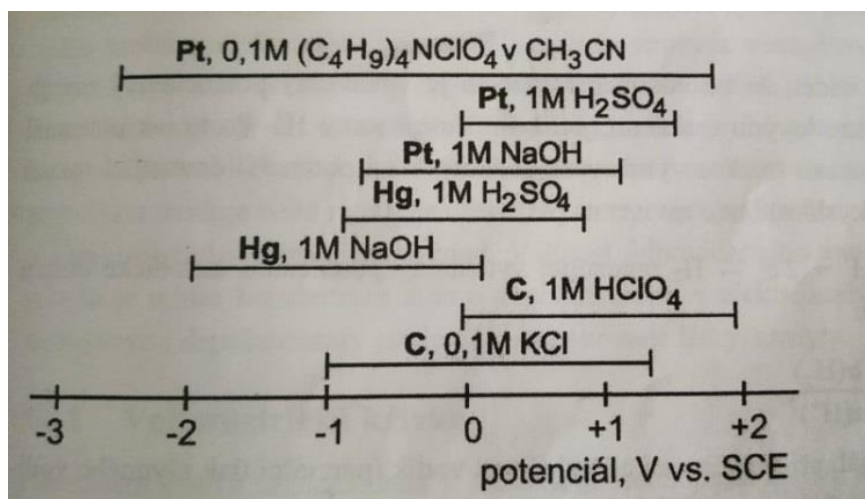
kde E je elektrický potenciál elektródy, E^0 je štandardný potenciál elektródy, R je molárna plynová konštanta ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T je teplota v kelvinoch, n je počet vymenených elektrónov, F je Faradayova konštanta (96485 C mol^{-1}) a a predstavuje aktivitu oxidovanej alebo redukovanej formy.

Podľa tejto rovnice zmena pomeru koncentrácií oxidovanej a redukovanej formy má za následok zmenu rovnovážneho redukčného potenciálu elektródy. To tiež znamená, že ak dokážeme udržať iný potenciál elektródy ako rovnovážny, elektróda odpovedá zvyšovaním pomeru koncentrácií v jej najbližšom okolí, oxidáciou redukovanej formy alebo redukciou oxidovanej formy. Elektróda odoberá alebo dodáva časticiam v roztoku elektróny. Pozorujeme elektrický prúd, pri oxidácii je to anodický prúd, pri redukcii katodický prúd [7].

Analyzované roztoky bývajú najčastejšie vodné, je možné taktiež stanovovať látky aj v nevodnom prostredí, napr. acetonitrile alebo dimethylsulfoxide. V prípade organických látok sa vzhľadom k ich obmedzenej rozpustnosti často pracuje v zmiešanom prostredí (voda, methanol, ethanol, apod.). Analyzovaný roztok musí byť dostatočne vodivý, preto sa do neho pridáva základný elektrolyt. Pre vodné prostredie sa používajú napr. minerálne kyseliny, hydroxidy či pufré, pre nevodné prostredia kvartérne amóniové bázy [6]. Na materiáli elektroaktívnej časti pracovnej elektródy, rozpúšťadle a použitom základnom elektrolyte závisí rozsah potenciálov, ktoré možno analyticky využiť, tzv. potenciálové okno. Príklady využiteľných potenciálových rozsahov elektród sú schematicky znázornené na obrázku 3. Z obrázku vyplýva:

- Ortuťové elektródy sú obecné vhodnejšie pre stanovenie látok katodickou redukciou pri negatívnych potenciáloch, pretože sa na ortuti vodík redukuje s veľkým prepätím, oveľa väčším ako na iných kovoch.
- Na platinové elektródy môžeme vkladať pozitívnejšie potenciály ako na elektródy ortuťové (ortuťová sa ľahko oxiduje, predovšetkým v prítomnosti niektorých aniónov

Cl^- a OH^-) a sú teda výhodné aj pre stanovenie látok anodickou oxidáciou. Uhlíková elektróda má správanie podobné elektróde platinovej [6].



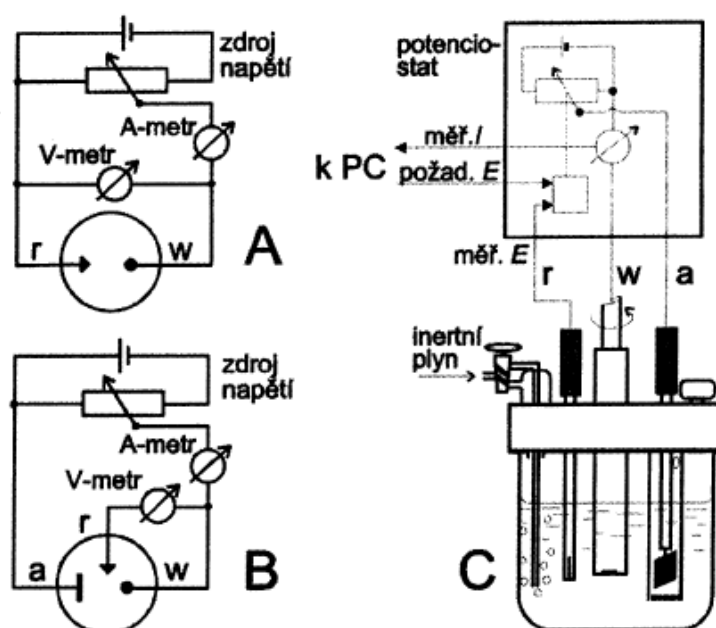
Obrázok 3 Približné využiteľné potenciálové rozsahy platinových, ortuťových a uhlíkových elektród vo vodných roztokoch a v prípade platinovej elektródy aj v roztoku nevodnom. Potenciály sú uvedené proti nasýtenej kalomelovej elektróde (SKE) [8]

1.2.2. Inštrumentácia

Elektrochemický článok pre voltampérometrické merania obsahuje okrem pracovnej elektródy ponorenej do analyzovaného roztoku ešte referenčnú (porovnávaciú) elektródu, spojenú s analyzovaným roztokom soľným mostíkom (dvojelektrodové usporiadanie), prípadne ešte tretiu, pomocnú elektródu (trojelektrodové usporiadanie) [9].

Základná schéma aparatury pre voltampérometrické meranie je na obr. 4. Napätie zo zdroja vkladané na pracovnú a referenčnú elektródu a prúd prechádzajúci článkom je meraný voltapérometrom. Vzhľadom k tomu, že potenciál nepolarizovateľnej referenčnej elektródy je konštantný, so zmenou vloženého napätia sa mení len potenciál polarizovateľnej pracovnej elektródy. Nevýhodou 2-elektrodového usporiadania voltampérometrického článku je to, že potenciál pracovnej elektródy nie je presne známy, pretože pri prechode prúdu sa časť vloženého napätia stratí na odpore analyzovaného roztoku. Preto sa v praxi používa 3-elektrodové usporiadanie článku [6]. Prúd prechádza iba medzi pomocnou a pracovnou elektródou a skutočný potenciál pracovnej elektródy sa meria medzi pracovnou a referenčnou

elektrodou za bezprúdového stavu. Elektrochemické reakcie, ktoré prebiehajú pri prechode prúdu na pomocnej elektróde, sa nesledujú. Bývajú to obvykle reakcie zložiek základného elektrolytu či oxidácie vody alebo redukcie vodíkových iónov vo vodných roztokoch. Zdrojom napätia v 3-elektrodovom usporiadaní je elektronický potenciostat. Je to prístroj ktorý udržiava potenciál pracovnej elektródy na požadovanej hodnote tým, že požadovaný potenciál neustále porovnáva s aktuálne zmeraným potenciálom a prípadný rozdiel automaticky vyrovnáva zmenou napätia na pomocnej elektróde [6].



Obrázok 4 Schéma zapojenia obvodu pre voltampérometrické meranie v dvojelektrodovom (A) a trojelektrodovom (B) usporiadaní elektrochemického článku a realizácie voltampérometrickej nádoby (C) pre meranie v trojelektrodovom usporiadaní; pracovnou elektródou je rotujúca disková elektróda, a-pomocná elektróda, r-referenčná elektróda, w-pracovná elektróda [10]

1.2.2.1 Polarizácia elektródy

Polarizácia je stav kedy elektródy nadobúdajú rozdielne hodnoty potenciálov vďaka prúdu, ktorý prechádza článkom. Elektródy, ktoré podliehajú polarizácii, sa nazývajú polarizovateľné. Potenciál nepolarizovateľných elektród závisí na prechádzajúcom prúde veľmi málo. Analyty pridávané do elektrolytu znižujú polarizáciu elektródy, spôsobujú jej depolarizáciu a preto sa nazývajú depolarizátory [6].

V základnom elektrolyte by mala byť elektróda v širokej oblasti potenciálov zpolarizovaná a mal by ňou pretekať len malý nabíjací prúd. Oblasť potenciálov využiteľná pre voltampérometrické meranie analytov je daná výberom látok obsiahnutých v elektrolyte a materiálom použitej elektródy. Po pridaní depolarizátora do elektrolytu dochádza pri dosiahnutí určitého potenciálu k oxidácií alebo redukcií látky. To spôsobí depolarizáciu elektródy a elektródou začne tiecť katodický alebo anodický prúd [3].

Samotný elektródový proces sa skladá z 3 základných dejov:

- transport depolarizátora k povrchu elektródy,
- vlastná elektródová reakcia,
- transport vzniknutých produktov reakcie od elektródy [11].

K transportu depolarizátora k elektróde prispievajú:

- konvekcia – pohyb roztoku,
- difúzia – z miesta s vyššou koncentráciou do miest s nižšou koncentráciou,
- migrácia – nabitých častíc [12].

Pokiaľ na pracovnej elektróde nemôže elektródový proces prebiehať, článkom netečie prúd. K tomu môže dochádzať, pokiaľ nie je v roztoku prítomná žiadna látka, ktorá by sa oxidovala alebo redukovala, alebo pokiaľ niektorý z vyššie uvedených krokov nie je dostatočne rýchly. V oboch prípadoch dochádza k polarizácií elektródy, kedy článkom preteká iba nízky tzv. nabíjací prúd [3].

Polarizačné a depolarizačné procesy môžeme popísať rovnicou (3), kde U_v je vložené napätie, P je polarizačné napätie, R elektrický odpor obvodu, I meraný prúd. Koncentračná polarizácia odpovedá rozdielu $P-U$, ohmická polarizácia odpovedá hodnote $I \times R$.

$$I = \frac{U_v - P}{R} \quad (3)$$

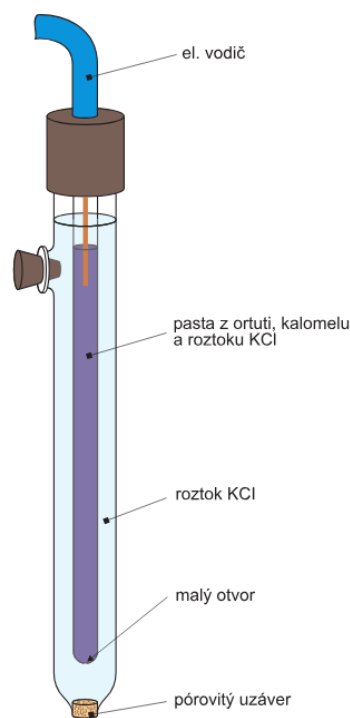
Hodnota $I \times R$ je pri veľkých koncentráciách základného elektrolytu zanedbateľná a hodnota polarizácie P sa rovná hodnote vloženého napätia U_v , čo sa prejaví ako zmena potenciálu polarizovateľnej elektródy. Výsledkom je rovnica (4), kde E_a je potenciál anódy a E_k je potenciálom katódy.

$$U = E_a - E_k \quad (4)$$

1.2.2.2 Referenčné elektródy

Referenčnou elektródou rozumieme poločlánok s konštantným potenciálom, na ktorý sa vzťahuje potenciál mernej (indikačnej) elektródy. Slúži ako porovnávací bod k meraniu alebo nastaveniu potenciálu pracovných elektród. Ich potenciál je presne definovaný a časovo stály [13]. Primárna referenčná elektróda je štandardná vodíková elektróda (SHE), ktorej potenciál je nulový pri všetkých teplotách. V praxi sa používajú tzv. sekundárne referenčné elektródy, ktoré sú konštrukčne oveľa jednoduchšie ako SHE. Sú to elektródy II. druhu, realizované ako kov pokrytý vrstvičkou svojej málo rozpustnej soli, ponorený do roztoku aniónov tejto soli. Najpoužívanejšie sú saturovaná kalomelová elektróda (SKE) a argentchloridová elektróda (Ag/AgCl).

Saturovaná kalomelová elektróda (obr. 5) je tvorená kovovou ortuťou, do ktorej zasahuje platinový drôtik slúžiaci ako prívod. Na povrchu ortuti je vrstvička chloridu ortuťnatého (kalomelu), ktorá je v styku s roztokom chloridu draselného KCl o definovanej aktivite chloridových iónov [14]. V sústave prebieha vratná elektrochemická reakcia podľa rovnice (5):



Obrázok 5 Schéma saturovanej kalomelovej elektródy [15]

Potenciál SKE je závislý na koncentrácií roztoku KCl, ktorý tvorí náplň elektródy [16]. Ag/AgCl namiesto vrstvy ortuti a kalomelu obsahuje strieborný drôtik potiahnutý vrstvičkou AgCl ponorený opäť v roztoku KCl. V sústave prebieha elektrochemická reakcia podľa rovnice (6):



1.2.2.3 Pomocné elektródy

Pomocné elektródy sú súčasťou trojelektrodového systému merania spolu s pracovnou a referenčnou. Musia byť tvorené z dobrého vodiča s dostatočnou plochou a elektrochemicky neaktívne. Používa sa platina (drôtik, pliešok, sieťka), uhlíková tyčinka alebo obyčajný nerezový drôtik. Najčastejšou variantov je platinová elektróda, resp. platinový drôtik [13].

1.2.3. Pracovné elektródy vo voltampérometrií /polarografií

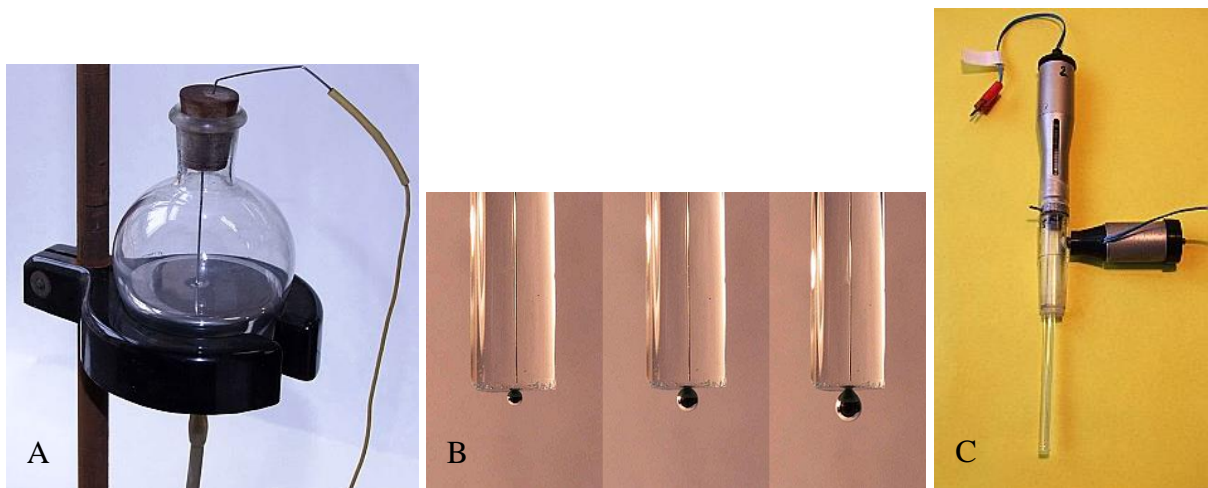
Hlavnou súčasťou elektrochemického článku je pracovná, alebo inak nazývaná aj indikačná elektróda. Jej výber vychádza vždy hlavne z typu analyzovanej látky a sledovanej redoxnej reakcie, pretože jednotlivé pracovné elektródy sa líšia využitelným potenciálovým rozsahom. Dôležité je taktiež usporiadanie analýz, kedy nie všetky elektródy sú vhodné pre meranie v prietoku alebo v terénnych analyzátoroch. Dôležitý je aj tvar a veľkosť elektródy.

1.2.3.1 Ortuťové pracovné elektródy

Od začiatkov polarografie sa ortuť používa ako elektrodový materiál a vďaka svojmu kvapalnému skupenstvu má špecifické vlastnosti. Je vynikajúci elektrodový materiál, ktorý sa vyznačuje veľkým prepätím vodíku a preto je výhodná pre prácu v zápornej potenciálovej oblasti. Naopak jej nevýhodou je malý anodický rozsah obmedzený oxidáciou ortuti a toxicita ortuti. Meranie prebieha na ortuťovej kvapke, ktorá je priebežne obnovovaná odkvapkávaním a tvorbou novej, čo vedie k minimalizácii problémov s pasiváciou elektródy. Povrch kvapky je dokonalo hladký a veľmi dobre reprodukovateľný. Vzhľadom k skupenstvu ortuti navyše odpovedá geometrický povrch kvapky skutočnému. Ortuťové elektródy umožňujú meranie pri vysokých negatívnych potenciáloch vďaka vysokému prepätiu vodíka. Vykazujú teda široký využitelný katodický potenciálový rozsah. Ďalšou výhodou je

schopnosť iných kovov rozpustiť sa v ortuti za vzniku amalgámu, a teda možnosť využitia rozpúšťacích techník [17]. V elektroanalýze sa používa niekoľko typov ortuťových elektród:

- *Kvapkajúca ortuťová elektróda* (dropping mercury electrode, DME) – skladá sa zo sklenenej kapiláry dlhej 12-20 cm s vnútorným priemerom 30-50 μm spojenej pružnou hadičkou so zásobníkom ortuti (Obr. 6A). Ortuť pravidelne odkvapkáva od ústia kapiláry v intervaloch 2-5 s (Obr. 6B). Táto elektróda je využiteľná v rozsahu potenciálov od +0,4 V do -2,6 V [6]. Výhodou DME je hlavne pravidelná obnova elektródového povrchu odkvapkávaním kvapky v priebehu merania, čo vedie k potlačeniu pasivácie elektródového povrchu. Nevýhodou môže byť závislosť elektródy na čase, nestabilita prietoku ortuti na počiatku vzniku kvapky a veľká spotreba ortuti [18].
- *Statická ortuťová kvapková elektróda* (static mercury drop electrode, SMDE) – tato elektróda je doplnená o solenoid s pohyblivým jadrom s vratnou pružinou, ktorá uzatvára kapiláru. Po uvoľnení uzáveru vteká do kapiláry ortuť a vzniká kvapka, ktorej veľkosť závisí na dobe otvorenia kapiláry. Ortuťová kvapka môže byť v pravidelných intervaloch menená a jej povrch zostáva konštantný. SMDE môže byť využívaná ako DME, samozrejme s pravidelne regulovanou veľkosťou kvapky, alebo ako HMDE [6].
- *Visiaca ortuťová kvapková elektróda* (hanging mercury drop electrode, HMDE) – povrch nie je v priebehu merania obnovovaný a celá analýza je prevedená na jednej visiacej ortuťovej kvapke. K odkvapnutiu kvapky dochádza medzi jednotlivými meraniami a každá ďalšia analýza tak prebieha na novom čistom povrchu. Táto elektróda je doplnená o elektronicky riadené klepadlo, ktoré mechanicky odtrháva starú kvapku pred vytvorením kvapky novej (obrázok 6C). Jej výhodou je menšia spotreba ortuti a menší nabíjací prúd, naopak nevýhodou je vyššie riziko pasivácie elektródy [17].
- *Filmová ortuťová elektróda* (mercury film electrode, MFE) – pripravuje sa elektrolytickým vylučovaním ortuti z roztoku ich solí na povrchu tuhej elektródy, kde ortuť vytvára súbor mikroskopických kvapiek. Povrch tejto elektródy nemožno ľahko obnovovať, ale stanovenia sú vďaka nepatrnému objemu ortuti citlivejšie ako u HMDE, a je to využiteľné hlavne v rozpúšťacej voltampérometrii [6].



Obrázok 6 Ortuťový rezervoár (A), časom rastúca ortuťová kvapka pri DME (B), visiaca ortuťová kvapková elektróda s klepadlom (C) [19]

1.2.3.2 Pevné pracovné elektródy

Pevné elektródy sú obvykle z elektródového materiálu valcovitého tvaru a z izolačného materiálu, ako je napríklad teflón. Ich veľkou výhodou je, že je možné pripraviť elektródy rôznych tvarov a veľkosti podľa aktuálnej potreby. Ich povrch je nehomogénny, v priebehu analýzy sa neobnovuje a môžu sa na ňom absorbovať látky z roztoku či látky vznikajúce elektródovými reakciami [6]. Dôležitým faktorom pri použití pevných elektród je teda stav ich povrchu. Pre dosiahnutie reprodukovateľných výsledkov obvykle vyžadujú predbežné úpravy ako je mechanické leštenie, elektrochemická aktivácia či regenerácia alebo použitie rôznych chemických a tepelných procesov pred každou analýzou. Aj cez možné komplikácie spojené s obnovovaním povrchu pevných pracovných elektród, majú zreteľné výhody oproti elektródam na báze ortuti. Vo všeobecnosti sú mechanicky stabilnejšie a majú väčší rozsah anodického potenciálu, čo umožňuje štúdium oxidácie veľa organických molekúl. Môžu byť použité aj v prúdiacich roztokoch [17]. Medzi najčastejšie materiály pevných elektród patria kovy, ako je platina alebo zlato a rôzne formy uhlíku [6].

Elektroanalytická chémia v súčasnosti vyvíja stále nové elektródové materiály a s tým spojené modifikácie. Výsledkom by mala byť elektróda so širokým potenciálovým oknom, malým šumom, použiteľná v rôznych rozpúšťadlách, odolná voči pasivácií, s možnosťou elektrochemickej regenerácie povrchu a minimálnou toxicitou materiálu [20].

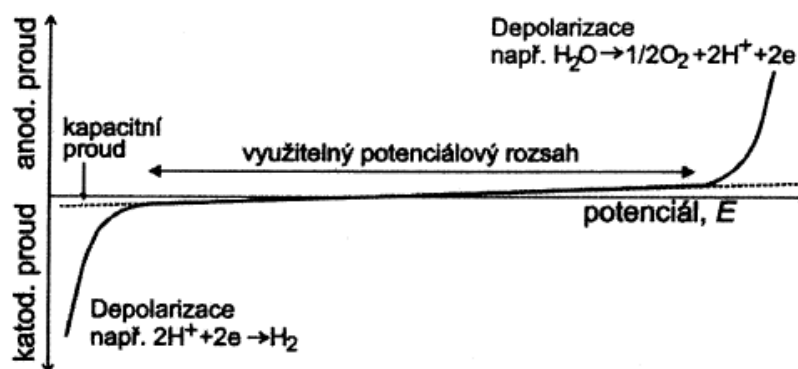
Popri klasických uhlíkových elektródach, ako je elektróda zo skleneného uhlíku (GCE) alebo grafitová elektróda, boli vyvinuté napr. uhlíkové pastové elektródy (CPE), kde je materiál elektródy tvorený pastou zo zmesi uhlíku a pastovacej kvapaliny [21]. Ich výhodou je jednoduché obnovovanie povrchu zotretím použitej vrstvy pasty a vytlačením novej pasty za pomoci piestu [22]. Nanešťastie sú s tým spojené aj nevýhody, a to krátka životnosť povrchu, horšia opakovateľnosť výsledkov a nižšia mechanická stabilita [23]. Ďalšou variantou pevných elektród sú elektródy kompozitné, ako napríklad strieborné kompozitné elektródy alebo kompozitné uhlíkové elektródy, ktoré vznikajú po zmiešaní polyméru, rozpúšťadla a uhlíku [24,25].

Alternatívou k ortuťovým elektródam, ktoré sú v posledných rokoch nežiaduce vďaka toxicite elektródového materiálu, sú pevné amalgámové elektródy [26]. V roku 2000 bola po prvý krát predstavená strieborná pevná amalgámová elektróda AgSAE výskumníkmi Yosypchukom a Novotným [27] a dentálna amalgámová elektróda uvedená Mikkelsonom a jeho kolektívom [28]. Pevné amalgámové elektródy sú kompromisom medzi ortuťovými a pevnými elektródami. Vzhľadom k prítomnosti ortuti v materiáli si zachovávajú veľmi dobré elektrochemické vlastnosti podobné ortuťovým elektródam, hlavne vysoké prepätie vodíka a možnosť elektrochemickej regenerácie povrchu. Navyše sú taktiež dostatočne mechanicky odolné, stabilné a môžu teda slúžiť v prietokových systémoch alebo terénnych analyzátoroch. Amalgám môže byť pripravený na báze rôznych kovov, a je možné takto získať rôzne elektródy s rôznymi elektrochemickými vlastnosťami [29]. Ako ďalšia alternatíva k ortuťovým elektródam sa rozšírili bizmutové elektródy, konkrétne bizmutová filmová elektróda BiFE, ktorá sa pripravuje elektrolyticky vylúčením tenkého povlaku bizmutu na povrchu pevnej elektródy [30]. Tento elektródový materiál je využívaný pri sledovaní katodických dejov, najmä pri stanovení kovov pomocou rozpúšťacích techník [31].

1.2.4. Polarografické/voltampérometrické krivky

Závislosť prúdu prechádzajúceho elektródou na jej potenciáli znázorňujú tzv. polarografické krivky, niekedy tiež označované ako $I-E$, polarizačné či voltampérometrické krivky. Tie sú dvojakého druhu, katódové a anódové. Pre vlastné meranie hrá významnú úlohu základný elektrolyt. Obsahuje veľkú koncentráciu iónov a zabezpečuje vodivosť analyzovaného roztoku. Používajú sa roztoky silných kyselín alebo zásad i rôzne pufre.

Je potrebné, aby sa zložky základného elektrolytu nezúčastnili elektródových reakcií na polarizovateľnej elektróde v čo najširšom rozsahu potenciálov. Potom možno totiž v tomto rozsahu sledovať elektródové reakcie stanovovaných depolarizátorov. Avšak pri dostatočne negatívnom potenciáli sa katódovej redukcii zúčastnia aj zložky základného elektrolytu. Býva to najčastejšie vylučovanie vodíka, ktoré v kyslých roztokoch prebieha pri menej negatívnych potenciáloch ako v alkalickom prostredí. Pri dostatočne pozitívnom potenciáli polarizovateľnej elektródy pozorujeme v roztoku základného elektrolytu anodickú oxidáciu. Touto oxidáciou môže byť rozpúšťanie materiálu elektródy. Na rezistentných elektródach z platiny alebo uhlíka to býva oxidácia vody na kyslík alebo oxidácia aniónu základného elektrolytu [32]. Oblasť polarograficky využiteľných potenciálov je vymedzená potenciálmi, pri ktorých sa v roztoku základného elektrolytu začnú prejavovať tieto javy vzrastom katodického a anodického prúdu (obr. 7). Pretože základný elektrolyt má obvykle najmenej stokrát väčšiu koncentráciu než stanovovaný depolarizátor, sú prúdy elektródových reakcií základného elektrolytu veľmi veľké a na zázname polarografickej krivky zachytíme len ich počiatok [32].



Obrázok 7 I-E krivka zmeraná v základnom elektrolyte [33]

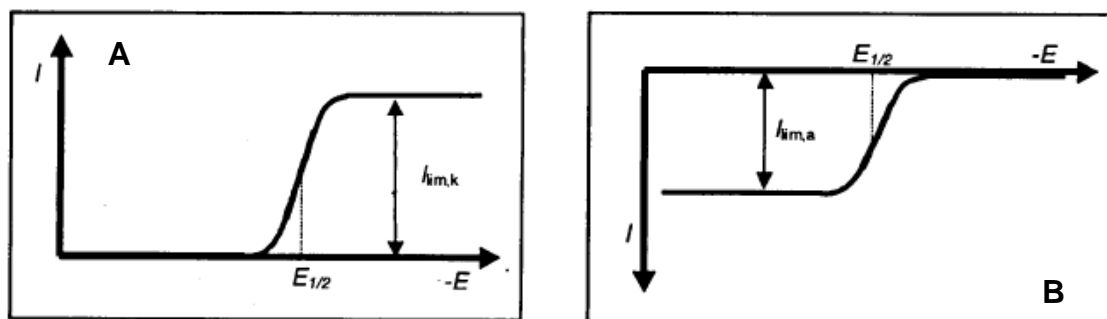
Za predpokladu, že v roztoku je len oxidovaná forma analytu (ox), môže sa táto forma redukovať na katóde, ak je na nej dostatočne negatívny potenciál; podľa dohody sa vynáša na pravú stranu. Elektróda je najskôr polarizovaná a takmer ňou neprechádza prúd. Pri dosiahnutí rozkladného potenciálu charakteristického pre danú elektroaktívnu látku nastáva depolarizácia elektródy. Začne elektrolyza elektroaktívnej látky a katodický prúd narastá (obr. 8A). Preto sa elektroaktívna látka nazýva tiež depolarizátor. Narastajúci prúd je

obmedzený difúziou a končí dosiahnutím limitného difúzneho prúdu (I_{lim}) a opätovnou polarizáciou elektródy. Limitného difúzneho prúdu sa dosiahne vtedy, keď difúzia častíc dosiahne maximálnej rýchlosti a prúd už ďalej nerastie [34]. Táto rýchlosť je úmerná koncentrácii reagujúcej látky v roztoku a preto aj limitný difúzny prúd je úmerný koncentracií. Prúd je možné pre kvapkajúcu elektródu vyjadriť tzv. Ilkovičovou rovnicou:

$$I = 0,732 \times n \times F \times D^{1/2} \times m^{2/3} \times t^{1/6}(c - c^0), \quad (7)$$

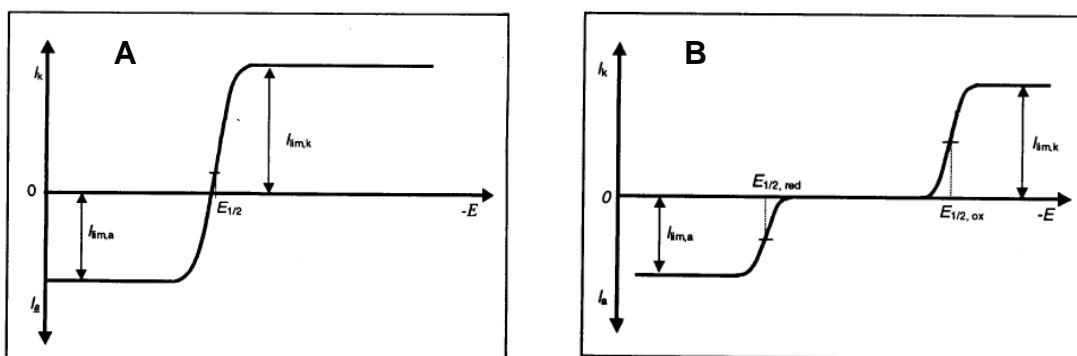
kde n je počet elektrónov, F je Faradayova konštanta, D je difúzny koeficient depolarizátoru, m je prietoková rýchlosť, t je doba kvapky, c je koncentrácia v roztoku, c^0 koncentrácia na povrchu elektródy a I je výsledný prúd [9, 11]. Dôležitým bodom je polvlnový potenciál $E_{1/2}$, ktorý charakterizuje depolarizátory a polohu krivky. Je to x-ová súradnica polarografickej krivky v polovici výšky vlny.

Polarizovateľná elektróda môže byť anódou, ak je v roztoku redukovaná forma schopná anodickej oxidácie. Pri dostatočne pozitívnom vloženom potenciáli (smer doľava) začne prebiehať oxidácia a to má za následok nárast anodického prúdu, ako je vidieť z priebehu anodickej polarografickej krivky (obr. 8B) [32].



Obrázok 8 Katodická (A) a anodická (B) I-E krivka [35]

Ak máme v roztoku obidve formy, anodickú aj katodickú, je polarizovateľná elektróda buď anódou alebo katódou, podľa vloženého napätia. V prípade, že na elektróde prebieha oxidácia aj redukcia veľmi rýchlo, tvorí oxidovaná a redukovaná forma tzv. reverzibilný redoxný systém. Katodická aj anodická krivka na seba nadväzujú a majú spoločný polvlnový potenciál (obr. 9A). Ak prebieha jeden z dejov (alebo oba) pomaly, krivky sú oddelené a každá má svoj polvlnový potenciál. Oxidovaná a redukovaná forma tvoria ireverzibilný redoxný systém (obr. 9B) [32].



Obrázok 9 Katodická a anodická I - E krivka v prítomnosti reverzibilného (A) a ireverzibilného (B) redoxného systému [36]

1.2.5. Voltampérometrické metódy

1.2.5.1 Jednosmerná voltampérometria (DCV)

Pri tomto type voltampérometrie je na pracovnú elektródu vkladané napätie s časom lineárne rastúci alebo klesajúci. Metódu môžeme považovať za stacionárnu pri konštantnom potenciáli vďaka dostatočne malej rýchlosti zmeny potenciálu v porovnaní s rýchlosťou ustáľovania rovnováhy pri elektróde [6].

Výsledná I - E krivka má tvar vlny. Polarografická vlna DME je charakteristická osciláciami spôsobenými odkvapkávaním ortuťovej kvapky, ktoré môžu spôsobiť problémy pri vyhodnocovaní výsledkov. Tie je možné eliminovať použitím metódy TAST polarografie, kedy je prúd meraný len krátko dobu tesne pred odkvapnutím kvapky a drží sa v pamäti po väčšinu doby života nasledujúcej kvapky. U DCV pri práci so stacionárnymi elektródami tieto oscilácie spojené so zmenou veľkosti povrchu elektródy v priebehu merania pozorované nie sú. Kvalitatívnym údajom je hodnota $E_{1/2}$ a kvantitatívnym hodnota limitného difúzneho prúdu I_{lim} . DCV umožňuje dosiahnutie limitu detekcie v rádoch $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ a rozlíšiť analyty, medzi ktorými je rozdiel polvlnového potenciálu $\Delta E_{1/2} > 200 \text{ mV}$ [3].

1.2.5.2 Cyklická voltampérometria (CV)

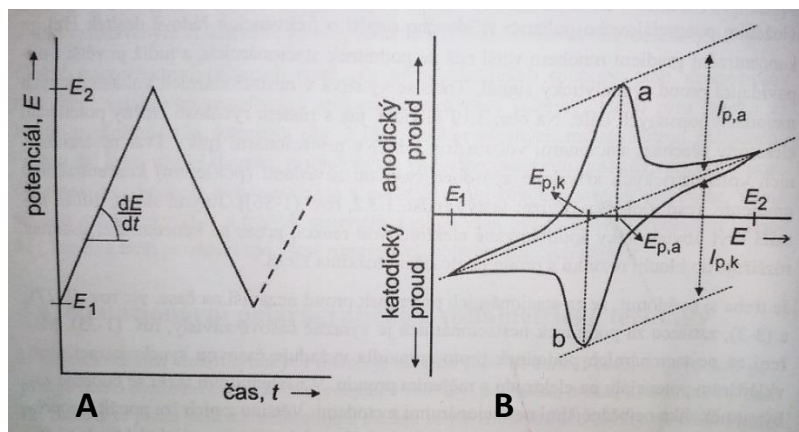
Cyklická voltampérometria je metóda pri ktorej sa na stacionárnu elektródu v nemiešanom roztoku vkladá potenciál trojuholníkového priebehu s rýchlosťou zmeny dE/dt (obr. 10). Polarizačná krivka má tvar píkov a prúd píkov závisí na rýchlosti časovej zmeny potenciálu. V dôsledku toho, že difúzia je relatívne pomalý transportný proces, pri dostatočne

vysokej rýchlosti polarizácie nestačia produkty elektródovej reakcie celkom oddifundovať od elektródy a za vhodných podmienok je možné ich pri opačnom smere potenciálovej zmeny detegovať [6].

Priame analytické využitie metódy je malé, hlavný význam má pri štúdiu elektródových reakcií. Z priebehu katodických a anodických kriviek je možné usúdiť mechanizmus elektródovej reakcie a jej reverzibilitu [6]. Pre reverzibilné reakcie platí:

- rozdiel potenciálov anodického a katodického píku $E_{p,a} - E_{p,k} = 0,059/n$,
- podiel prúdov anodického a katodického píku $I_{p,a}/I_{p,k} = 1$,
- potenciál pík je nezávislý na rýchlosti zmeny potenciálov, dE/dt , a je o $28,5/n$ mV negatívnejší (u katodického) či pozitívnejší (u anodického píku) ako polvlnový potenciál.

Pre ireverzibilný dej závisí rozdiel potenciálov anodického a katodického píku na rýchlosti polarizácie, dE/dt , a hodnotách α (koeficient prenosu náboja) a k^0 (heterogénna rýchlostná konštanta v cm s^{-1}) charakterizujúcich ireverzibilný dej, pričom z tejto závislosti je možné uvedené parametre určiť. Priama úmera medzi výškou píku (I_p) a odmocninou z rýchlosti polarizácie ($v^{1/2}$), $(dE/dt)^{1/2}$, platí len u difúziou riadených dejov. Pri dejoch kontrolovaných adsorpciou je I_p priamo úmerná v , tj. dE/dt [6].

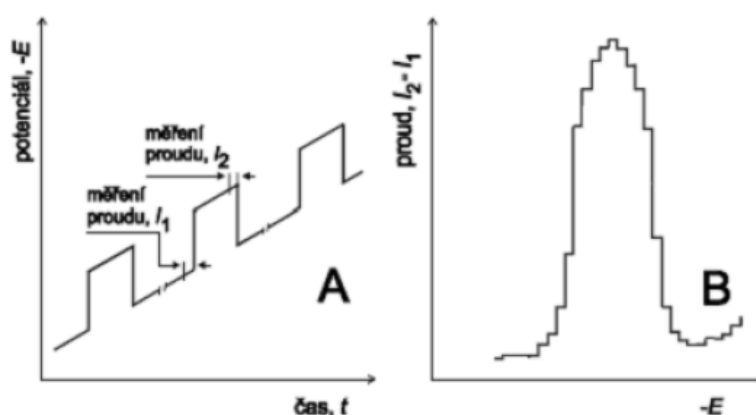


Obrázok 10 Potenciálový program (A) a prúdová odozva (B) pri cyklickej voltampetrii.

V uvedenom príklade je na cyklickom voltampérograme vidieť, ako sú produkty vzniknuté oxidáciou (pík a) pri opačnom smere potenciálovej zmeny redukované (pík b) [36]

1.2.5.3 Diferenčná pulzná voltampérometria (DPV)

Z pulzných metód má práve táto metóda najväčší význam pre elektroanalytickú chémiu. Pri tejto metóde je potenciál lineárne s časom sa meniaci prekladaný napäťovým pulzom o amplitúde 10 až 100 mV a v dobe trvania rádovo desiatok ms. Prúd je meraný vždy pred začiatkom a na konci každého pulzu. Rozdiel medzi týmito prúdmi sa vynáša v závislosti na vkladanom napätí, čo vidíme na obrázku 11. Výsledný prúdový signál má tvar píkovo, ich polohu (E_p) možno využiť pre kvalitatívnu analýzu, výška píku I_p je úmerná koncentrácii analytu. Limit detekcie sa obvykle pohybuje okolo $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ a je možné rozlíšiť látky s rozdielom polvlnových potenciálov $E_{1/2} > 50 \text{ mV}$ [3, 32].



Obrázok 11 Priebeh potenciálu vkladaneho na pracovnú elektródu v závislosti na čase (A), výsledná voltampérometrická krivka (B) [37]

1.2.5.4 Rozpúšťacia voltampérometria

Metóda je charakteristická stanovením elektroaktívnych zložiek počas ich rozpúšťania. Najskôr sa pri elektrolytickom nahromadení pri vhodnom potenciáli vylučuje analyt na elektróde, a to za stáleho miešania. Po vypnutí miešania a ustálení roztoku zahájením lineárnej zmeny potenciálu dochádza k elektrolytickému rozpúšťaniu nahromadených produktov elektrolyzy a zaznamená sa rozpúšťací prúdový signál [32]. Rozdelenie rozpúšťacej voltampérometrie:

- anodická rozpúšťacia voltampérometria (ASV),
- katodická rozpúšťacia voltampérometria (CSV),
- adsorpčná rozpúšťacia voltampérometria (AdSV) [9].

1.2.6. Bórom dopovaná diamantová elektróda

Predmetom tejto diplomovej práce je stanovenie vybraných liečiv s využitím bórom dopovanej diamantovej elektródy. Preto bude tejto elektróde a jej vlastnostiam venovaná samostatná kapitola.

V posledných dvoch desaťročiach je venovaná veľká pozornosť novému elektródovému materiálu, bórom dopovanému diamantu (BDD). Príprava BDD filmov je obvykle založená na princípe chemickej depozície pár. K depozícii diamantového filmu je najčastejšie používaná zmes metánu a vodíku, dopovanie bórom je dosiahnuté pridávaním diboránu do zmesi plynu [38,39]. Medzi výhodné vlastnosti BDD patrí mechanická aj chemická stabilita, nízky zvyškový prúd a biokompatibilita [40-44]. Ďalšou dôležitou vlastnosťou bórom dopovaného diamantu (BDD) je široké potenciálové okno, závislé na kvalite filmu a dosahujúce hodnôt až okolo 3,5 V. Bórom dopované diamantové elektródy (BDDE) preto umožňujú prevádzať elektrochemické reakcie pri potenciáloch, ktoré nie je možné dosiahnuť iným spôsobom [42,45].

Pri elektrochemickom stanovení organických látok na pevných elektródach dochádza veľmi často k ireverzibilnej adsorpcii reakčných produktov či niektorých zložiek vzorky na povrchu elektródy, čo má za následok jej pasiváciu. Na adsorpciu polárnych látok sú citlivé skoro všetky sp^2 uhlíkové elektródy (tzn. elektródy v ktorých prevažujú uhlíkové atómy s sp^2 hybridizáciou, napr. grafitové). Je to spôsobené hlavne prítomnosťou polárnych skupín na ich povrchu. BDD je vďaka svojmu sp^3 charakteru (uhlíkové atómy sú na tomto mieste v sp^3 hybridizácii) voči adsorpcii polárnych látok na jeho povrchu značne rezistentný. Vďaka malej náchylnosti k pasivácii sú BDD filmy vo veľa prípadoch ideálnym elektródovým materiálom, ktorý je možné použiť k vysoko citlivému stanoveniu veľkého množstva organických aj anorganických látok bez predošlej úpravy povrchu elektród [40].

Diamantový povrch elektródy môže byť H-terminovaný vďaka katodickej predúprave alebo O-terminovaný anodickou predúpravou. Predúprava BDDE má význam pre zvýšenie voltamperometrického signálu, zabránenie pasivácii elektródového povrchu a zaistenie lepšej reprodukovateľnosti odozvy analytu. Základom je elektrochemická oxidácia a stabilizácia povrchu elektródy pri pozitívnom potenciáli okolo +2,0 V, kedy dochádza k rozkladu vody podľa rovnice (8), za vzniku OH radikálov, ktoré pôsobia ako silné oxidačné činidlá [46].



Udržovanie H-terminovaného povrchu elektródy je veľmi obtiažne kvôli jednoduchej elektrochemickej oxidácií a oxidácií povrchu BDDE vzdušným kyslíkom. Rehydrogenácia oxidovaného povrchu elektródy vkladáním negatívneho potenciálu musí byť vykonaná opakovane vždy tesne pred elektrochemickými experimentami [47]. Vedľa katodického, resp. anodického pretreatmentu využívajú niektorí autori leštenie elektródy pomocou aluminy alebo cyklovaním v určitom rozsahu potenciálu.

Pre použitie BDDE v elektrochémií organických látok existujú 2 hlavné smery: elektrochemická oxidácia organických látok obsiahnutých v odpadných vodách na BDD anóde založená na ich úplnej konverzii alebo deštrukcii [48-50], a užitie BDDE ako elektrochemického senzoru vo voltampérometrii alebo pri ampérometrickej detekcii v prietokových metódach [51, 52, 53]. V oblasti elektroanalytickej chémie je bórom dopovaná diamantová elektróda veľmi často využívaná hlavne pri analýze organických látok, ako sú pesticídy [54], liečivá [55], rôzne karcinogénne látky [56], biomarkery radov ochorení [57], a pod. Vzhľadom k širokému potenciálovému oknu boli tieto elektródy využité rovnako pri stanovení katiónov kovov [58]. Vzhľadom k tomu, že sa voltampérometrické metódy často potýkajú s problémami spojenými s nízkou selektivitou a niekedy aj nedostatočnou citlivosťou, bola značná pozornosť venovaná rovnako možnostiam modifikácií BDDE s cieľom tieto nevýhody eliminovať. Využívané sú dva základné smery. Prvým je modifikácia povrchu BDDE elektrolyticky vylučovaním nanočastíc rôznych kovov (Au, Pt, Pd, Cu, Bi, Ni) [59]. Ďalšou možnosťou je fyzikálna, chemická alebo biochemická modifikácia povrchu, kedy sa využíva princíp adsorpcie rôznych materiálov na povrchu alebo chemickej väzby malých organických molekúl, biomolekúl a polymérov [60].

V rámci tejto diplomovej práce bude BDDE použitá pre štúdium voltampérometrického správania liečiv zo skupiny oxikámov.

1.3. Oxikámy

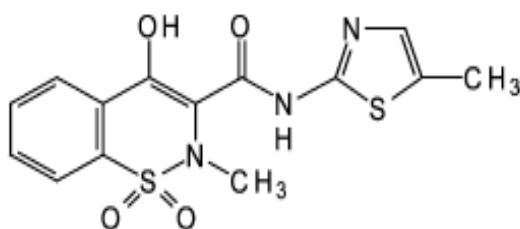
Oxikámy sa radia k nesteroidným antireumatikám (nesteroidné antiflogistiká, NSA). Majú široké využitie v liečbe akútnych i chronických bolestivých syndrómov rôzneho pôvodu, najmä vertebrogénnych a kĺbových, ďalej na krátkodobú liečbu pooperačnej a poúrazovej bolesti. Všeobecne sa využíva ich analgetického, protizápalového a antipyretického účinku. Vo veľkej miere sú podávané tiež u niektorých typov bolestí hlavy,

predovšetkým pre ich široký výber a nízke náklady. Najčastejšie sa používajú v liečbe cervikogénnych bolestí hlavy (cervikokraniálneho syndrómu), a to najmä v akútnej fáze. Pri chronickom podávaní hrozí riziko vzniku gastropatie z nesteroidných antireumatík. NSA sa ďalej užívajú v akútnej liečbe migrény, kde sú vymedzené pre záchvaty miernej a strednej intenzity. Je možno ich odporučiť aj ako účinnú krátkodobú záchrannú medikáciu u bolestí hlavy tenzného typu v období dekompenzácie. Medzi známe oxikámy patrí meloxicám, piroxikám, lornoxikám a tenoxikám [61]. Predmetom tejto diplomovej práce sú meloxicám a lornoxikám, ktorým sú taktiež venované nasledujúce kapitoly.

1.3.1. Meloxicám

1.3.1.1 Charakteristika

Meloxicám, ktorého štruktúrny vzorec je uvedený na obr. 12, je vysokoúčinný nesteroidný protizápalový liek triedy kyseliny enolovej, oxikámových derivátov (NSAID), ktorý má vyššiu aktivitu cyklooxygenázy-2 (COX-2), ako proti cyklooxygenáze-1 (COX-1) s potenciálne vysokým protizápalovým a analgetickým účinkom. Je indikovaný na liečbu reumatoidnej artritídy, osteoartritídy a iných ochorení kĺbov. Vzhľadom na veľmi nízku rozpustnosť v kyslom prostredí môže spôsobiť iba málo lokálnych gastrointestinálnych vedľajších účinkov [62].



Obrázok 12 Chemická štruktúra meloxicámu [63]

Meloxicám je dostupný vo forme tabliet Meloxicam Mylan, ktoré obsahujú aj pomocné látky ako celulózu, kukuricový škrob, monohydrát laktózy, citrát sodný a oxid kremičitý. Prípravok Meloxicam Mylan by sa nemal užívať počas posledných troch mesiacov tehotenstva, pri krvácajúcich stavoch do žalúdka alebo čreva, pri závažnej poruche funkcie pečene alebo zlyhanie obličiek a pri problémoch so srdcom. Tento liek môže byť spojený s

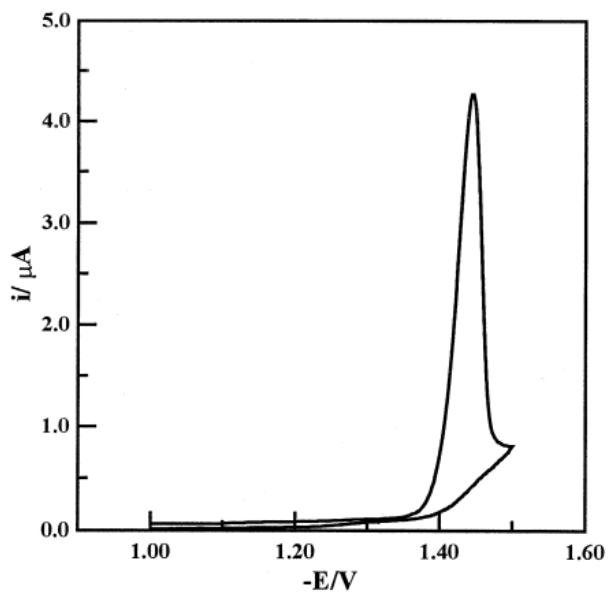
miernym zvýšením rizika srdcového záchvatu alebo cerebrovaskulárnymi príhodami. Akékoľvek riziko je pravdepodobnejšie pri vyšších dávkach a dlhodobej liečbe. Doporučená dávka lieku je 15 mg raz denne. Ak sa príznaky zlepšia, dávka sa môže znížiť na 7,5 mg denne [64].

Meloxicám je takmer úplne metabolizovaný na inaktívne metabolity izoenzýmami cytochrómu P450 (CYP450). CYP2C9 je primárne zodpovedný za metabolizmus meloxicámu, zatiaľ čo CYP3A4 hrá menšiu úlohu. Medziproduktový metabolit 5'-hydroxymetyl meloxicám sa ďalej metabolizuje na 5'-karboxy-meloxicám, ktorý predstavuje hlavný metabolit. Iba stopy nezmenenej materskej zlúčeniny sa vylučujú močom (0,2%) a stolicou (1,6%). Rozsah vylučovania močom bol potvrdený pri neznačených viacnásobných dávkach 7,5 mg: 0,5 %, 6 % a 13 % dávky bolo zistených v moči vo forme meloxicámu, 5'-hydroxymetyl a 5'-karboxymetabolity. Polčas rozpadu meloxicámu je 15-20 hodín [65].

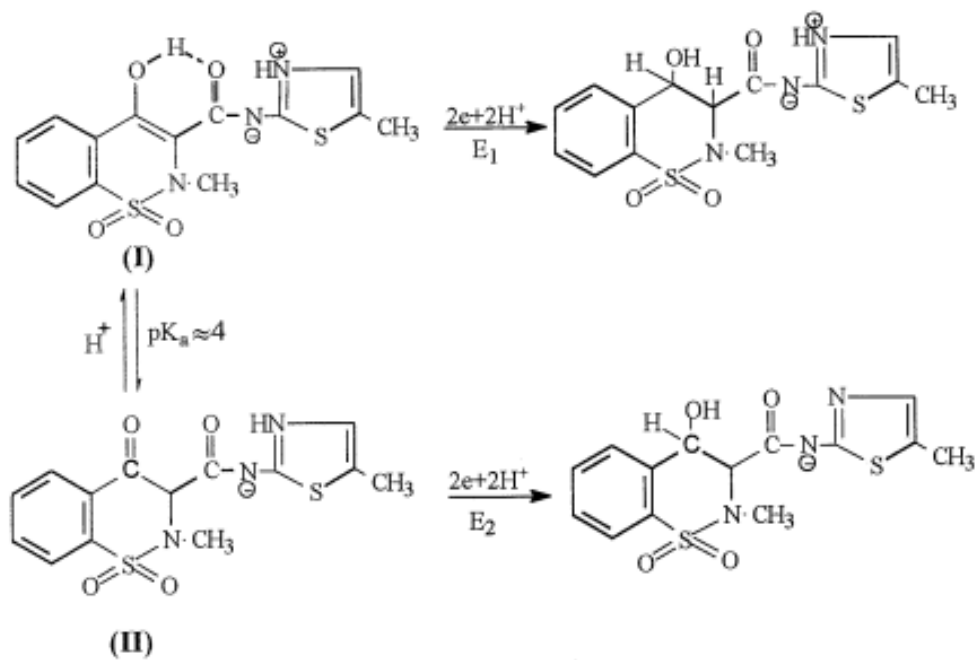
1.3.1.2 Stanovenie meloxicámu

Meloxicám je možné stanoviť pomocou rôznych inštrumentálnych metód. Najčastejšie sa používa vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, a to v spojení napr. s detektorom s diodovým alebo fotodiodovým polom [66], UV fotometrickým detektorom [67], alebo hmotnostným spektrometrom [68]. Ďalšou možnosťou je využitie optických metód ako spektrofotometria [69,70,71] alebo fluorimetria [72]. Tieto metódy sú obvykle veľmi citlivé a selektívne, ale často vyžadujú zložitú prípravu vzorky k analýze a sú časovo aj inštrumentálne náročné. Vzhľadom k tomu, že meloxicám je elektrochemicky aktívny, ponúka sa voltampérometria ako lacná, rýchla a jednoduchá alternatíva k vyššie uvedeným metódam.

Elektrochemická redukcia meloxicámu bola študovaná pomocou HMDE a bola navrhnutá metóda jeho stanovenia s využitím rozpúšťacej square wave voltampérometrie (AdS SWV) [73,74]. Autori zistili, že meloxicám poskytuje jeden redukčný signál okolo potenciálu -1400 mV (obr. 13) a Beltagi a kol. vo svojej práci rovnako navrhli mechanizmus redukcie meloxicámu, ktorý je schématicky znázornený na obr. 14. Ďalší autori použili pre stanovenie meloxicámu diferenčne pulznú polarografiu DPP v spojení s SMDE [75]. Vhodným pre stanovenie sa ukázalo slabé kyslé prostredie acetátového pufru (pH 5) alebo Brittonov-Robinsonov pufor (BRB, pH 4) a navrhnuté metódy boli aplikované pri analýze farmaceutických prípravkov aj krvnej plazmy.



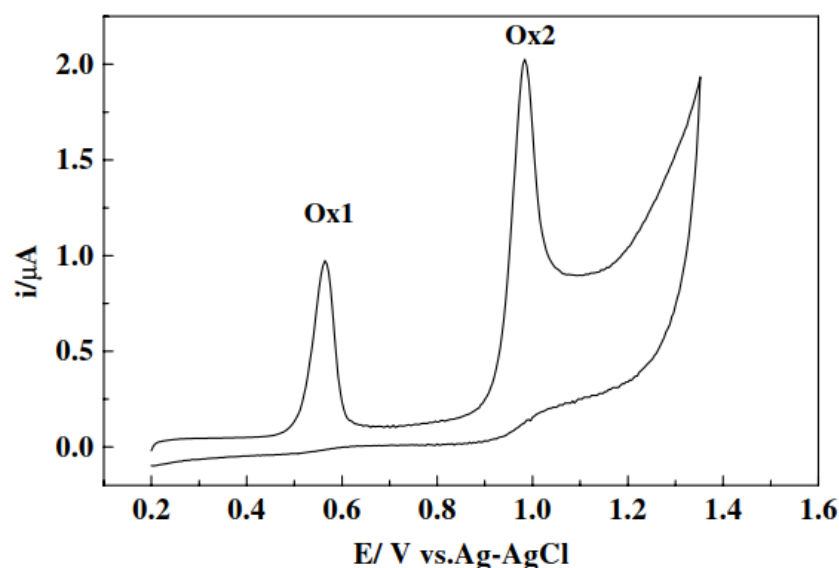
Obrázok 13 Cyklický voltampérogram redukcie meloxicámu nameraný na HMDE (BRB pH 4,0, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $c_{MLX} = 5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) [76]



Obrázok 14 Schéma redukcie meloxicámu na HMDE [77]

Oxidačné správanie meloxicámu bolo po prvý krát popísané na uhlíkovej pastovej elektróde (CPE) [78]. Bolo zistené, že toto liečivo poskytuje dva oxidačné signály pri

potenciáloch +500 a +1000 mV (obr. 15). Podľa autorov odpovedá prvý signál oxidácii amidovej funkčnej skupiny a druhý signál oxidácii enolovej skupiny. Stanovenie prebiehalo v prostredí BRB o pH 3. Ďalšie práce boli zamerané na využitie modifikovaných uhlíkových elektród pre stanovenie meloxicámu v modelových roztokoch, vo farmaceutických prípravkoch aj v biologických vzorkách. Wang a kol. použili elektródu zo sklovitého uhlíku modifikovanou kyselinou cysteínovou, a to elektrochemickou cestou z L-cysteínu pomocou CV [79]. Pri analýze reálnych vzoriek sa osvedčili taktiež metódy využívajúce CGE modifikovanou karboxylovým oxidom grafenu a poly-L-lyzínom [80] alebo CPE pripravenou z pasty tvorenej uhlíkovými nanotrubičkami modifikovanými tzv. MIP (molecular imprinted polymer) [81].



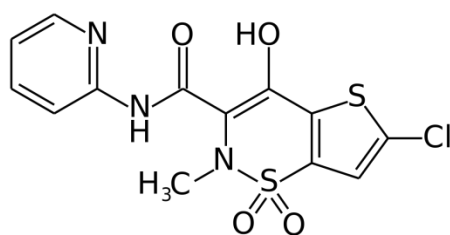
Obrázok 15 Cyklický voltampérogram oxidácie meloxicámu nameraný na CPE (BRB pH 3,0, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $c_{MLX} = 5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) [82]

1.3.2. Lornoxikám

1.3.2.1 Charakteristika

Lornoxikám (obr. 16) je rovnako ako meloxicám nesteroidný liek a pôsobí protizápalovo a protireumaticky [83]. Mechanizmus účinku lornoxikámu súvisí prevažne s inhibíciou syntézy prostaglandínov vedúcou k potlačeniu zápalu. Lornoxikám nemá vplyv

na vitálne funkcie (napr. na telesnú teplotu, dychovú frekvenciu, tlak, EKG). Rozsiahlo sa metabolizuje v pečeni, predovšetkým hydroxyláciou na inaktívny 5-hydroxylornoxikám. Priemerný čas eliminácie pôvodnej látky sú 3-4 hodiny. Liečivo lornoxikám v obalenej tabletovej forme je možné zakúpiť v lekárni ako Xefo 8 mg. Spôsobuje krátkodobú úľavu od akútnej až stredne silnej bolesti a symptomatickú úľavu od bolesti a zápalu pri osteoartritíde a reumatoidnej artritíde. Dávkovanie lieku je individuálne podľa dohovoru s lekárom, ktorý nastaví optimálnu hladinu lieku. Maximálna doporučená denná dávka je 16 mg, teda rozdelenie 2-3× za deň. Liek sa užíva perorálne. Lornoxikám sa neodporúča deťom a dospievajúcim do 18 rokov vzhľadom na nedostatok údajov o bezpečnosti a účinnosti. Ďalej sú možné komplikácie pri užívaní lieku u pacientov s poruchami funkcie obličiek, poruchami zrážania krvi a krvácavými stavmi do gastrointestinálneho traktu. Nedoporučuje sa rovnako ako meloxicám, užívať liek počas tehotenstva a počas pôrodu, a to hlavne z nedostatku klinických údajov o gravidných ženách vystavených účinku lornoxikámu [84].



Obrázok 16 Chemická štruktúra lornoxikámu [85]

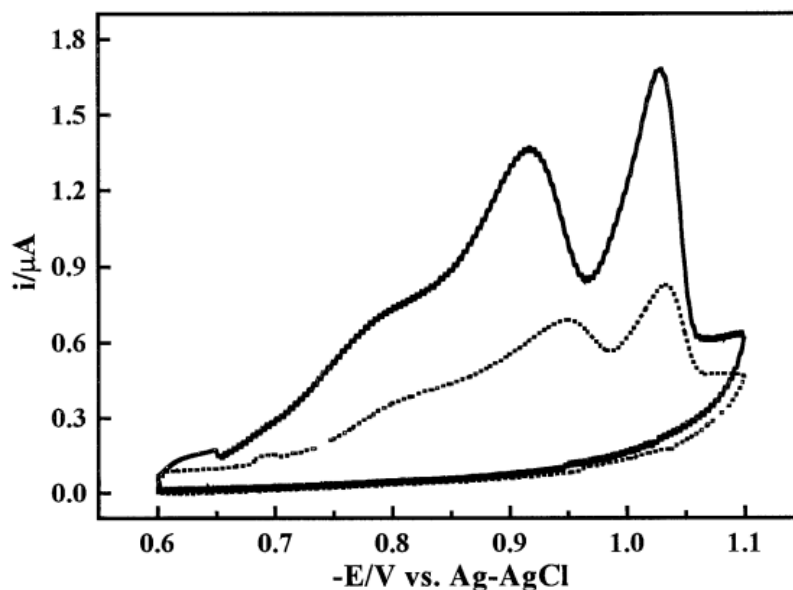
Lornoxikám je z 99 % viazaný na plazmatické proteíny (takmer výlučne na sérový albumín). Lornoxikám je úplne metabolizovaný cytochrómom cyp 2C9, pričom hlavným metabolitom je 5'-hydroxy-lornoxikám a v nezmenenej forme sa vylučujú iba zanedbateľné množstvá intaktného lornoxikámu v moči. Približne 2/3 liečiva sa eliminujú pečeňou a 1/3 obličkami v aktívnej forme. Polčas života 3-5 hodín [65].

1.3.2.2 Stanovenie lornoxikámu

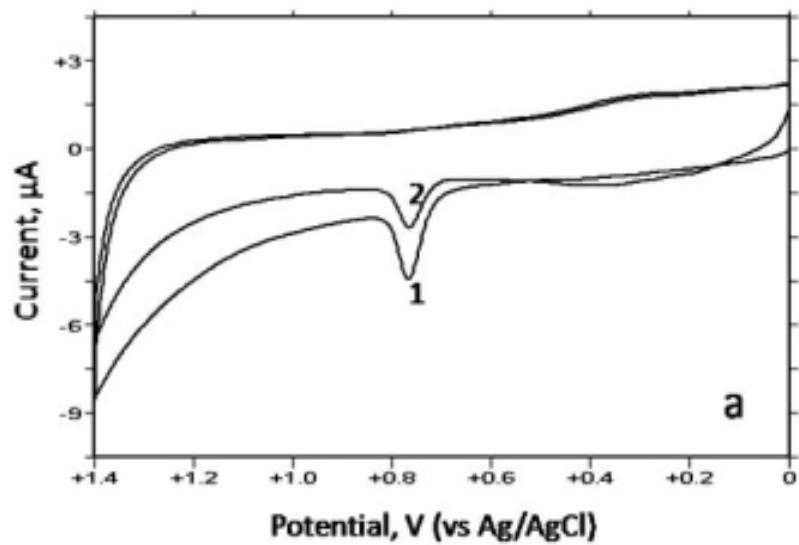
Rovnako ako meloxicám aj lornoxikám môžeme stanoviť pomocou inštrumentálnych metód. Najčastejšie sa opäť využíva kvapalinová chromatografia v kombinácii s UV

detekciou [86], hmotnostným spektrometrom [87] alebo elektrochemickou detekciou [88]. Ďalšou popísanou metódou je spektrofotometrické stanovenie [89].

Čo sa týka elektroanalytických metód, bolo najskôr popísané redukčné správanie lornoxikámu s využitím SMDE ako indikačnej elektródy [90]. Na obr. 17 je uvedený cyklický voltampérogram získaný v prostredí $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ kyseliny chloristej. Je zrejmé, že analyt poskytoval dva redukčné signály okolo potenciálov -900 a -1000 mV . Súčasne autori preukázali, že sa lornoxikám na povrchu ortuťovej elektródy akumuluje a je možné teda pre jeho stanovenie využiť rozpúšťaciu voltampérometriu. Navrhnutá metóda bola aplikovaná pri analýze séra. Ďalšou možnosťou stanovenia lornoxikámu v ľudskom sére bolo použitie elektród na báze uhlíka, kde autori študovali jeho oxidačné správanie [91]. Oxidácia lornoxikámu poskytla jediný ireverzibilný pík ako je zdokumentované na obr. 18. Autori priradili tento signál oxidácií hydroxylovej skupiny.



Obrázok 17 Cyklický voltampérogram redukcie lornoxikámu nameraný na SMDE ($0,05 \text{ mol L}^{-1} \text{ HClO}_4$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $c_{\text{LRX}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; bodkovaná čiara – bez akumulácie, plná čiara s akumuláciou pri potenciále -600 mV po dobu 15 s) [91]

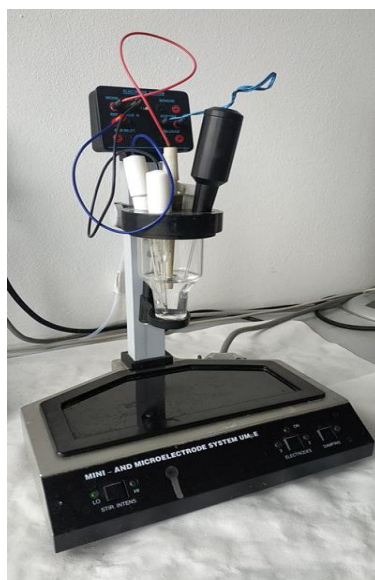


Obrázok 18 Opakovaný cyklický voltampérogram oxidácie lornoxikámu nameraný na GCE ($0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $c_{\text{LRX}} = 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; 1 – prvý sken, 2 – druhý sken) [90]

2. Experimentálna časť

2.1. Prístrojové vybavenie

Všetky voltampérometrické merania boli prevedené pomocou počítačom riadeného Eco-Tribo polarografu (obr. 19, Polaro-Sensors, Česká republika) so softwarom Polar.PRO verzia 5.1 pre Windows XP, a to v trojelektrodovom usporiadaní. Ako pracovná elektróda slúžila komerčne dostupná BDDE (Windsor Scientific, Veľká Británia) s pracovným povrchom $7,07 \text{ mm}^2$ a pomerom B/C v plynnej fáze pri depozičnom kroku deklarovaným výrobcom 1000 ppm. Ako referenčná elektróda bola použitá nasýtená argentchloridová elektróda Ag/AgCl (KCl, saturovaná) a ako pomocná elektróda platinový (Pt) drôtik (obe Monokrystály Turnov, Česká republika).



Obrázok 19 Používaný Eco-Tribo polarograf so zapojeným elektrodovým systémom

Všetky experimenty sa uskutočnili pri laboratórnej teplote ($23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) a za prítomnosti kyslíka, teda bez bublania roztoku inertným plynom. Pomocou stolného pH-metra Fisher Scientific AB 150 (Fisher Scientific, Massachusetts, USA) boli merané hodnoty pH. Analytické váhy (Denver Instrument, New York, USA) boli používané pre navažovanie chemikálií, automatické mikropipety Biohit (Biohit PLC, Helsinki, Fínsko) a Eppendorf (Eppendorf Research, Hamburk, Nemecko) slúžili na presné dávkovanie roztokov. Na podporu rozpúšťania štandardov bola využitá ultrazvuková kúpeľ Bandelin SONOREX (Schalltec GmbH, Nemecko).

2.2. Použité chemikálie

Štandardné roztoky meloxicámu (čistota $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Česká republika) a lornoxicámu (čistota $\geq 98\%$, Cayman Chemical Company, USA) o koncentrácií $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ boli pripravované rozpustením odpovedajúcej navážky v metanole (MetOH, Acros Organics, New Jersey, USA). Ako základný elektrolyt bol používaný Brittonov-Robinsonov pufor (BRB) v rozmedzí pH 2-12. Požadované pH bolo docielené miešaním kyslej a alkalickéj zložky pod pH metrom. Kyslá zložka o koncentrácií jednotlivých kyselín $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ bola pripravená riedením $85\% \text{ H}_3\text{PO}_4$ a $99,8\% \text{ CH}_3\text{COOH}$ a rozpustením navážky práškovej H_3BO_3 o čistote $99,8\%$ (Lachema, Česká republika). $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ (Lachema, Česká republika) predstavoval alkalickú zložku. Pre docielenie pH okolo 1 bola použitá HNO_3 (Lachema, Česká republika) o koncentrácii $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Ako analyzované vzorky sme využili tabletové formy oboch oxikámov a to konkrétne pre meloxicám Meloxicam Mylan 15 mg (Viapharma Brno, držiteľ rozhodnutia o registrácii Generics UK) a pre lornoxicám tablety Xefo Rapid 8 mg (firma Takeda, Rakúsko). Odporúčaná dávka meloxicámovej tablety je $7,5 \text{ mg}$ raz denne (pol tablety Meloxicamu Mylan 15 mg). V prípade nedostatočného účinku liečby môže lekár zvýšiť dávku na 15 mg meloxicámu denne. V prípade lornoxicámu je zvyčajná denná dávka tabliet Xefo Rapid $8\text{-}16 \text{ mg}$ rozdelených do dávok po 8 mg dvakrát denne alebo 16 mg raz denne.

2.3. Procedúry

2.3.1. Príprava BDDE k meraniu

BDDE bola pred používaním aktivovaná zmeraním 20 cyklických voltampérogramov od počiatočného potenciálu ($E_{\text{poč}}$) -1000 mV do potenciálu obratu (E_{obratu}) $+2200 \text{ mV}$ pri rýchlosti polarizácie (ν) 100 mV s^{-1} . Aktivácia prebiehala vždy na začiatku pracovného dňa priamo v roztoku základného elektrolytu. Medzi jednotlivými meraniami nebol povrch elektródy nijak regenerovaný ani inak upravovaný. Počas meraní bol teda povrch BDDE pravdepodobne O-terminovaný vzhľadom k práci pri značne pozitívnych hodnotách potenciálu a ľahkej oxidácii diamantu i len vzdušným kyslíkom.

2.3.2. Voltampérometrické merania

Používanou pracovnou elektródou bola BDDE. Pri štúdiu voltampérometrického správania MLX i LRX bola použitá metóda CV v rozsahu potenciálov od $E_{\text{poč}} -500$ mV do $E_{\text{obratu}} +2200$ mV pri v 100 mV s⁻¹ a boli skúmané závislosti na pH a rýchlosti polarizácie. Pre meranie koncentračných závislostí a pre stanovenie MLX v modelových i reálnych vzorkách bola použitá metóda DPV v prostredí BRB o pH 3 a v rozsahu potenciálov od $E_{\text{poč}} 0$ mV do konečného potenciálu (E_{kon}) +2000 mV. Optimalizované parametre DPV boli nasledujúce: rýchlosť polarizácie 40 mV s⁻¹, výška pulzu +60 mV a šírka pulzu 30 ms.

Výšky píkov boli vyhodnocované od základnej línie vložené ako priamka spájajúca minimá pred a za píkom. Výsledné voltampérometrické krivky, ich závislosti a kalibračné priamky boli získané pomocou softwaru MS Excel 2010 (Microsoft, USA). Parametre kalibračných kriviek a odpovedajúce intervaly spoľahlivosti na hladine významnosti $\alpha = 0,05$ boli počítané pomocou programu Project 1 [92]. Limit detekcie (*LOD*) bol počítaný ako 3× smerodajná odchýlka úseku podelená smernicou a medza stanoviteľnosti (*LOQ*) ako 10× smerodajná odchýlka úseku podelená smernicou.

2.3.3. Analýza farmaceutického prípravku

Tableta Meloxicam Mylan, bola pre analýzu pripravená nasledovne. Jedna tableta Meloxicamu Mylan (15 mg) bola rozdrvená na prášok v trecej miske a rozpustená v 100 mL rozpúšťadla. Testované boli štyri možnosti – rozpúšťanie v MetOH, acetonitrile, 0,1 mol L⁻¹ HNO₃ a 0,1 mol L⁻¹ NaOH. Najlepšie sa liekový prášok rozpustil v MetOH a ten bol vybraný ako najvhodnejšie rozpúšťadlo pre nasledujúce analýzy farmaceutických prípravkov. Získaný roztok bol pred analýzou filtrovaný, aby bol odstránený zákal a nerozpustené zvyšky spojiva. Následne bola vykonaná analýza vzorky metódou štandardného prídavku. Meranie prebiehalo v polarografickej nádobke v prostredí BRB o pH 3 a objeme 15 mL. K elektrolytu bola napipetovaná vzorka MLX o objeme 35 μL a dva po sebe nasledujúce štandardné prídavky roztoku MLX ($c = 0,001$ mol L⁻¹, $V = 15$ μL). Meranie prebehlo opakovanne 5× po sebe.

Tableta XefoRapid (8 mg) obsahujúca ako účinnú látku LRX bola pre analýzu pripravená rovnakým spôsobom ako MLX. Tabletú sme rozpúšťali vzhľadom na dobrú rozpustnosť rovnako v prostredí MetOH a takto pripravený roztok bol zfiltrovaný. Meranie prebiehalo v polarografickej nádobke v prostredí BRB o pH 3 a objeme 20 mL, následne bola

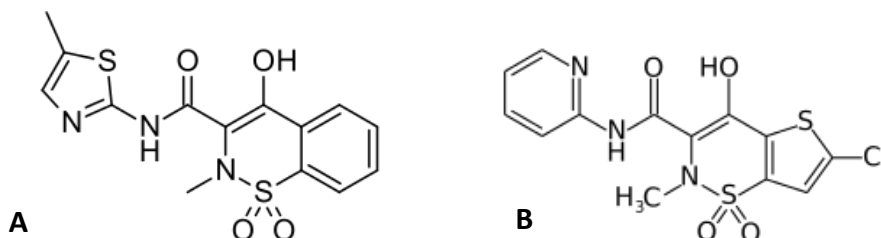
napipetovaná vzorka LRX o objeme 93 μL a opäť dva po sebe nasledujúce štandardné prídavky roztoku LRX ($c = 0,001 \text{ mol L}^{-1}$, $V = 20 \mu\text{L}$). Meranie bolo prevedené 5 \times .

Z opakovaných stanovení bola vždy vypočítaná priemerná hodnota obsahu účinných látok na tabletu s príslušným intervalom spoľahlivosti, výťažnosti a relatívna smerodajná odchýlka (RSD_5) opakovaného stanovenia.

3. Výsledky a diskusia

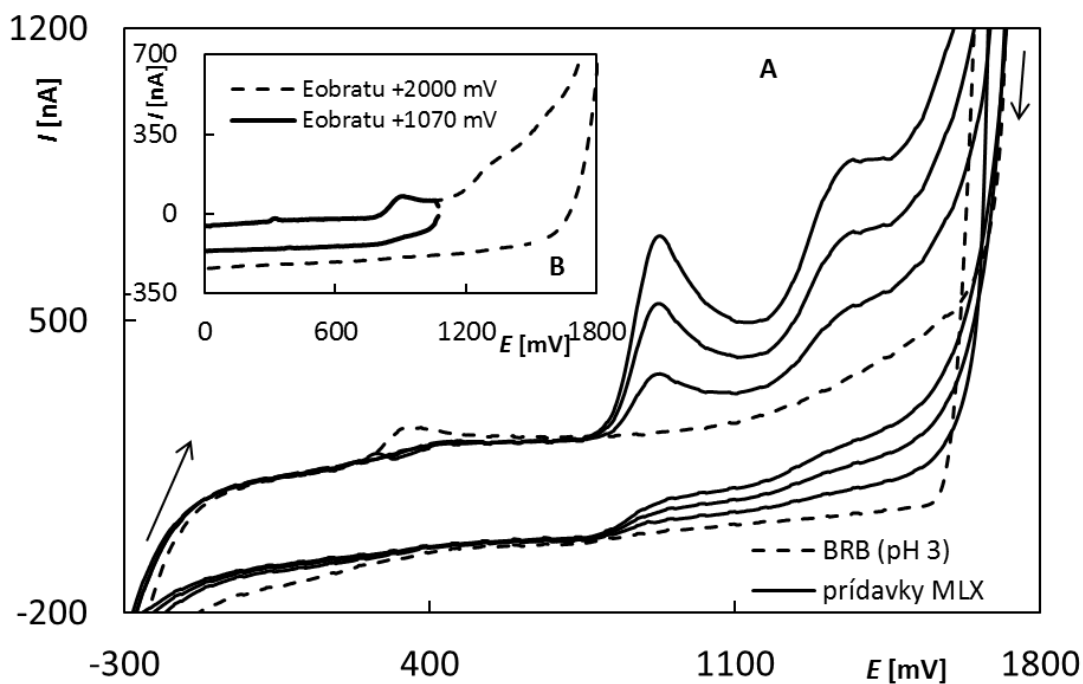
3.1. Voltampérometrické správanie meloxicámu a lornoxikámu

V úvode experimentálnej časti diplomovej práce boli najskôr pripravené štandardy oboch študovaných oxikámov meloxicámu (MLX) a lornoxikámu (LRX) o koncentrácii $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Štruktúrne vzorce oboch analytov sú pre ilustráciu uvedené na obr. 20. Pre štúdium ich voltampérometrického správania bola použitá metóda CV a boli zmerané prvé cyklické voltampérogramy oboch liečiv na BDDE, ktoré sú uvedené na obr. 21 (MLX) a 22 (LRX). Meranie prebiehalo v prostredí BRB o pH 3 v rozsahu potenciálov od $E_{\text{poč}} -500 \text{ mV}$ do $E_{\text{obratu}} +2000 \text{ mV}$, pri $\nu 100 \text{ mV s}^{-1}$. Koncentrácia analytov v polarografickej nádobke bola $c_{\text{MLX}} = c_{\text{LRX}} = 1 \times 10^{-5} - 3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

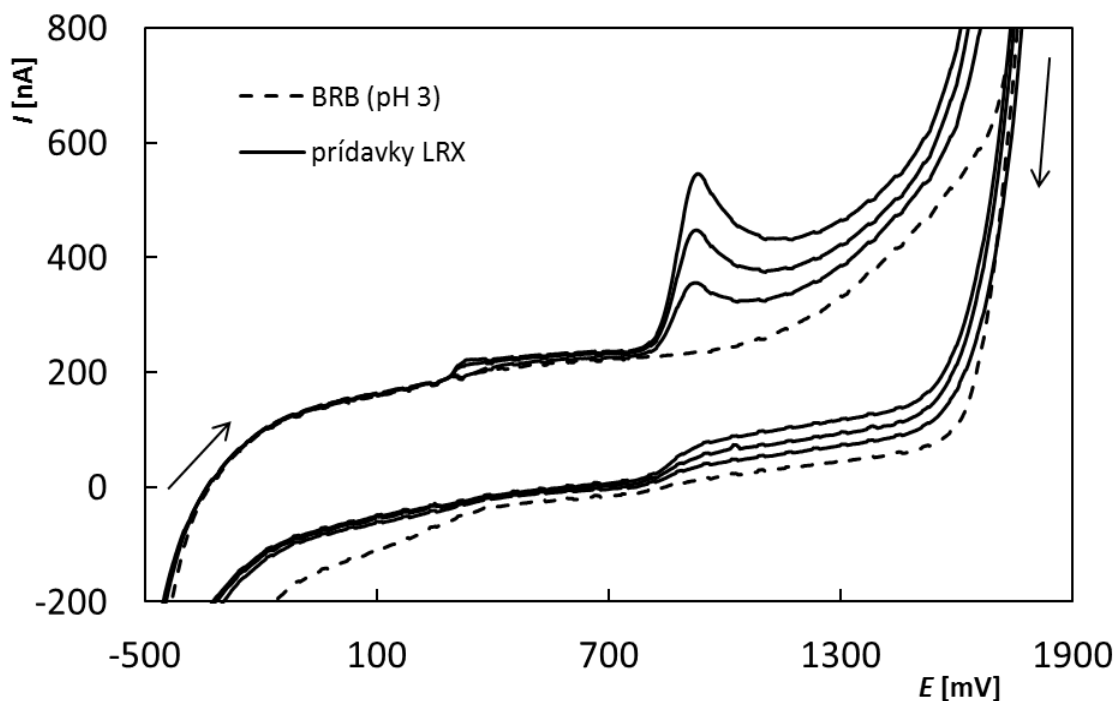


Obrázok 20 Štruktúrne vzorce meloxicámu (A) a lornoxikámu (B)

Za uvedených podmienok MLX poskytol 2 oxidačné signály, čo bolo v súlade s publikovanými prácami [80]. Prvý pík sa nachádzal okolo potenciálu +900 mV a podľa literatúry by mal odpovedať oxidácii amidovej funkčnej skupiny. Druhý signál bol pozorovaný pri potenciáli okolo +1400 mV a mal by odpovedať oxidácii hydroxylovej skupiny [80]. Sledované elektrochemické reakcie sú ireverzibilné, pretože na katodickej krivke nebola zaznamenaná žiadna odpovedajúca redukčná prúdová odozva. Vzhľadom k tomu, že boli pozorované dva oxidačné signály, mohlo by sa stať, že v prípade prvej oxidácie by sa mohlo jednať o reverzibilnú reakciu, ktorá ale spätne neprebíha kvôli nasledujúcej oxidačnej reakcii. Preto bol zmeraný taktiež cyklický voltampérogram s potenciálom obratu +1070 mV, teda hneď za prvým oxidačným signálom MLX. Ako je vidieť z vloženého záznamu na obrázku 21B, bolo potvrdené, že aj v tomto prípade sa jedná o ireverzibilnú reakciu, pretože opäť nebol pozorovaný žiaden odpovedajúci katodický pík. Vzhľadom k polohe a tvaru bol pre ďalšie štúdie a hlavne pre vývoj metódy stanovenia zvolený prvý oxidačný signál MLX.

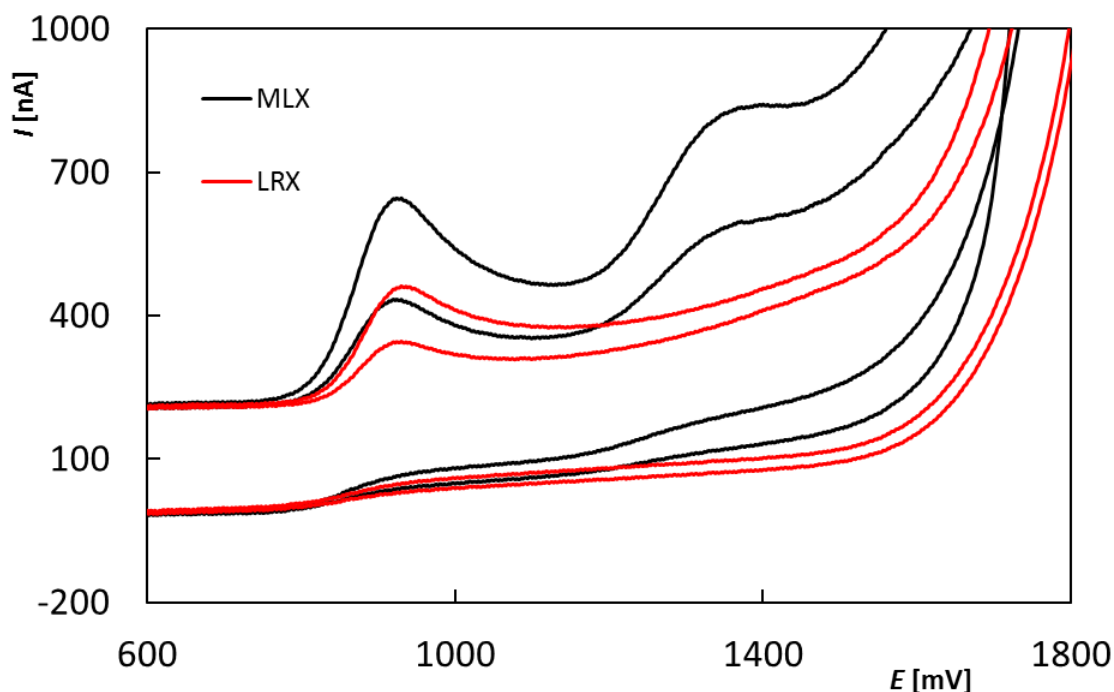


Obrázok 21 A – Cyklické voltampérogramy MLX zaznamenané na BDDE, B – Cyklické voltampérogramy MLX s rôznym potenciálom obratu zaznamenané na BDDE; Metóda: CV, elektrolyt – BRB (pH 3), $E_{poč} = -500$ mV, $E_{obratu} = +2000$ mV (A, B) a $+1070$ mV (B), $v = 100$ mV s⁻¹, $c_{MLX} = 1 \times 10^{-5}$ – 3×10^{-5} mol L⁻¹ (A) a 1×10^{-5} mol L⁻¹ (B)



Obrázok 22 Cyklické voltampérogramy LRX zaznamenané na BDDE; Metóda: CV, elektrolyt – BRB (pH 3), $E_{poč} = -500$ mV, $E_{obratu} = +2000$ mV, $v = 100$ mV s⁻¹, $c_{LRX} = 1 \times 10^{-5}$ – 3×10^{-5} mol L⁻¹

Za rovnakých experimentálnych podmienok bol pre LRX pozorovaný iba jeden anodický signál okolo potenciálu +910 mV (obr. 22). Rovnako v tomto prípade sa jednalo o ireverzibilnú elektródovú reakciu, pretože nebol pozorovaný žiaden odpovedajúci katodický pík. Pre lepšie porovnanie signálov sú na obr. 23 uvedené voltampérogramy oboch látok pri rovnakej koncentrácii (1×10^{-5} a $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Je zrejmé, že prvý oxidačný signál MLX a pík poskytovaný LRX sa prekrývajú, čo by svedčilo o oxidácii rovnakej funkčnej skupiny. V literatúre je však pík LRX prisudzovaný oxidácii hydroxylovej skupiny [91], zatiaľ čo prvý oxidačný pík MLX je priradený oxidácii amidovej skupiny a až druhá odozva pri pozitívnejšom potenciále oxidácii hydroxylovej funkčnej skupiny [79].

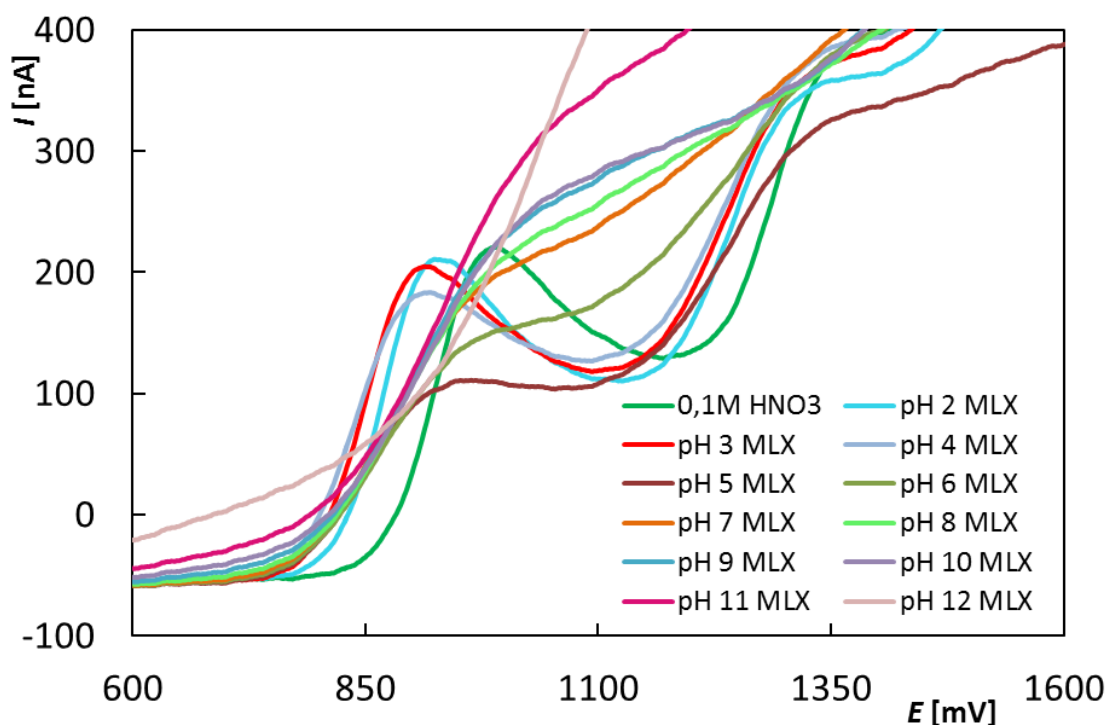


Obrázok 23 Cyklické voltampérogramy MLX a LRX zaznamenané na BDDE; Metóda: CV, elektrolyt – BRB (pH 3), $E_{poč} = -500 \text{ mV}$, $E_{obratu} = +2000 \text{ mV}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $c_{LRX} = c_{MLX} = 1 \times 10^{-5}$ – $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

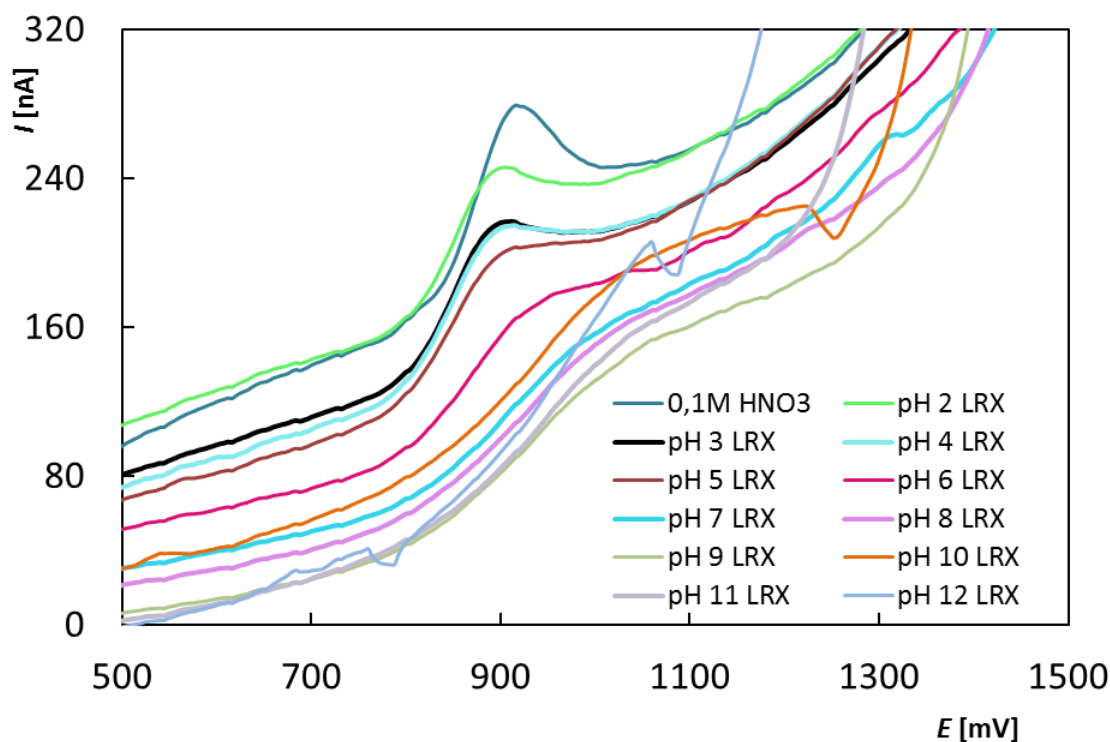
3.1.1. Závislosť na pH

Prostredie významne ovplyvňuje elektroaktivitu látok a preto bola na začiatku meraní študovaná závislosť voltampérometrickeho správania MLX a LRX na pH. Opäť bola použitá metóda CV a rôzne pH prostredia zaistovali $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ a BRB (pH 2-12). $E_{poč}$ bol

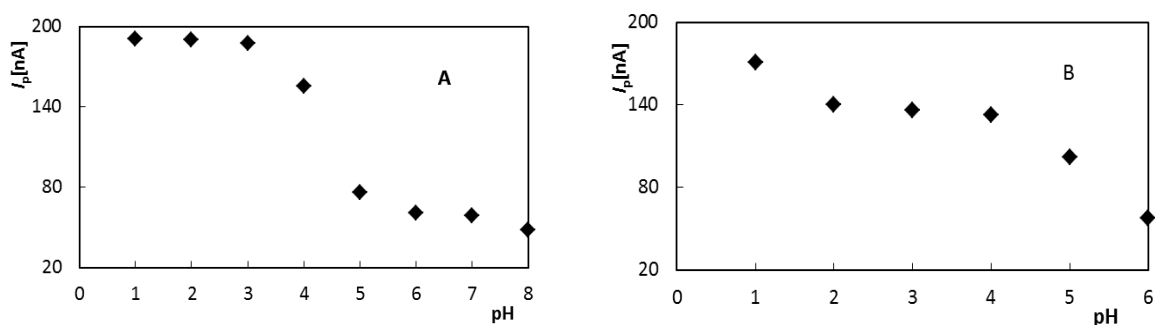
-500 mV, $E_{\text{kon}} +2000$ mV, ν 100 mV s⁻¹, $c_{\text{MLX}} 1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ a $c_{\text{LRX}} 5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Na obr. 24 (MLX) a 25 (LRX) sú zobrazené anodické časti cyklických voltampérogramov zaznamenaných na BDDE v závislosti na pH prostredie. Na obr. 26 sú vynesené závislosti výšky píku (u MLX sa jedná o prvý anodický signál) na pH základného elektrolytu. V prípade MLX bol z kriviek odčítaný vysoký signál v kyslom a slabo kyslom pH prostredí. V neutrálnom a zásaditom prostredí sa prúdové odozvy MLX znižovali. Pre ďalšie merania bolo preto vhodné kyslé prostredie. V prípade LRX bol najlepší signál zaznamenaný rovnako v kyslom prostredí. Čím viac sa pH blížilo k neutrálnejším a zásaditejším hodnotám, signály viditeľne klesali. Pre ďalšie štúdie týkajúce sa závislosti na rýchlosti polarizácie bolo zvolené prostredie BRB o pH 3 pre obe študované látky a voľbe optimálneho pH pre ich stanovenie bude znova venovaná pozornosť v kapitole týkajúcej sa vývoja metód.



Obrázok 24 Anodické časti cyklických voltampérogramov MLX zaznamenaných na BDDE v závislosti na pH prostredie; Metóda: CV, elektrolyt: 0,1 mol L⁻¹ HNO₃ a BRB (pH 2-11), $E_{\text{poč}} = -500$ mV, $E_{\text{obratu}} = +2000$ mV, $\nu = 100$ mV s⁻¹, $c_{\text{MLX}} = 1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹



Obrázok 25 Anodické časti cyklických voltampérogramov LRX zaznamenaných na BDDE v závislosti na pH prostredia. Metóda: CV, elektrolyt: $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ a BRB (pH 2-11), $E_{poč} = -500 \text{ mV}$, $E_{obratu} = +2000 \text{ mV}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $c_{LRX} = 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$



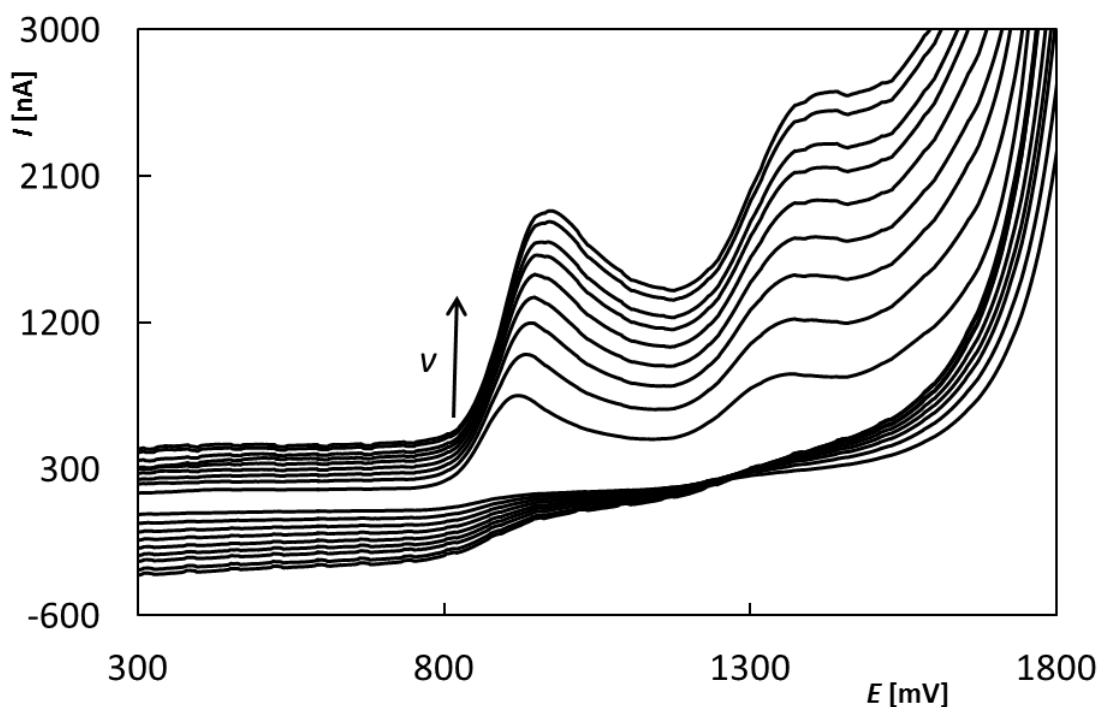
Obrázok 26 Závislosti I_p na pH základného elektrolytu pre MLX (A) a LRX (B); Metóda: CV, elektrolyt – $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ a BRB (pH 2-8), $E_{poč} = -500 \text{ mV}$, $E_{obratu} = +2000 \text{ mV}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $c_{MLX} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $c_{LRX} = 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

3.1.2. Závislosť na rýchlosti polarizácie

Priebeh závislosti I_p na v môže pomôcť určiť vedúce deje prebiehajúcich elektródových reakcií. Preto bol zisťovaný vplyv rýchlosti polarizácie na tvar a výšku

voltampérometrických píkov, a to v kyslom prostredí BRB o pH 3. Koncentrácia MLX počas meraní bola $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Použitá bola CV v rozsahu potenciálov od -500 mV do $+2000 \text{ mV}$ a v bola menená po 50 mV s^{-1} v rozmedzí $50\text{-}450 \text{ mV s}^{-1}$. Z obr. 27 je evidentné, že oba prúdové signály MLX narastajú so zvyšujúcou sa rýchlosťou polarizácie. Súčasne sa posúvajú smerom k pozitívnejším hodnotám potenciálu, čo odpovedá ireverzibilnému priebehu reakcií. Vyhodnocovaný bol iba prvý oxidačný signál MLX. Na obrázku 28A je zobrazená závislosť I_p na v . Môžeme tvrdiť že signál nerastie lineárne s rastúcou rýchlosťou polarizácie a sledované reakcie zrejme nie sú pod významným vplyvom adsorpcie. Závislosť intenzity signálu na $v^{1/2}$ zobrazená na obr. 28B sa blíži lineárnemu priebehu ($r = 0,989$) čo môže značiť významný vplyv difúzie. Táto závislosť je charakterizovaná rovnicou (9).

$$I_p[\text{nA}] = (0,0342 \pm 0,0018) (v [\text{mV s}^{-1}])^{1/2} + (6,61 \pm 0,52), r = 0,989 \quad (9)$$



Obrázok 27 Cyklické voltampérogramy MLX v závislosti na rýchlosti polarizácie zaznamenané na BDDE; Metóda CV, elektrolyt: BRB (pH 3), $E_{poč} = -500 \text{ mV}$, $E_{obratu} = +2000 \text{ mV}$, $v = 50\text{-}450 \text{ mV s}^{-1}$, $c_{MLX} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

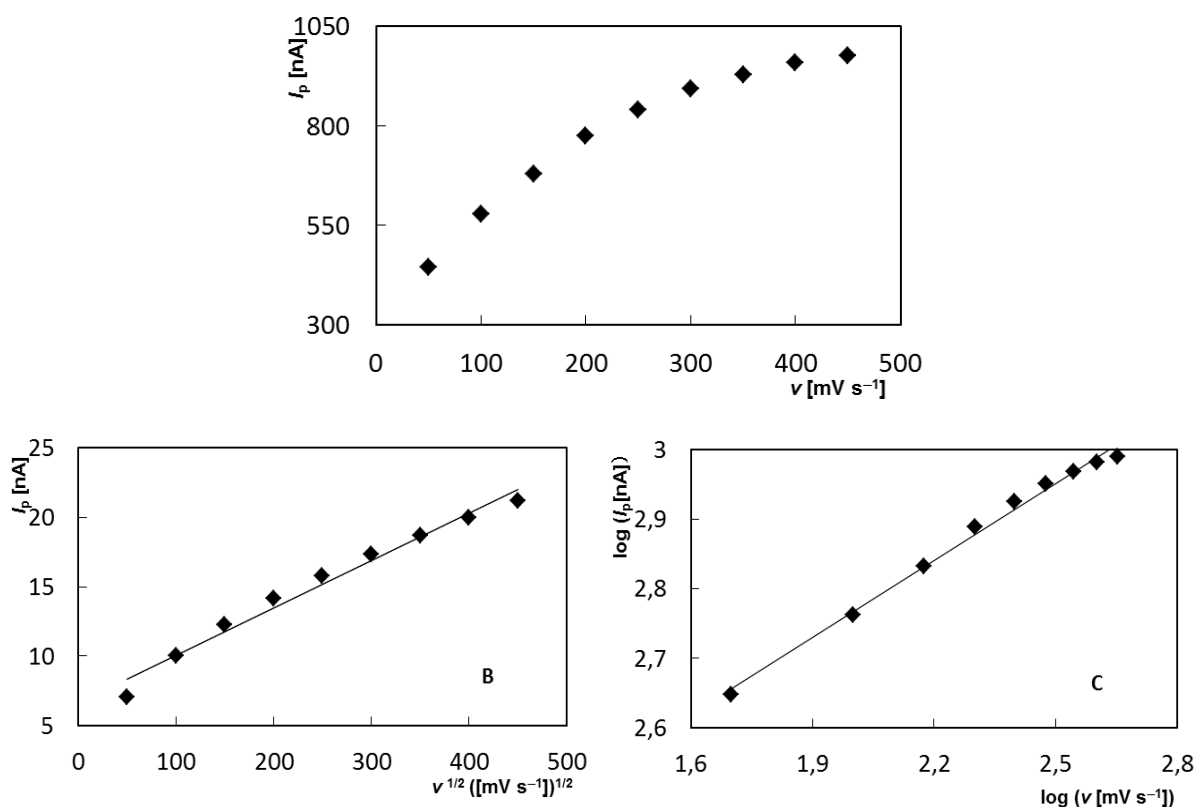
Pre spresnenie záverov bola vynesená ešte logaritmická závislosť prúdu na rýchlosti $\log(I_p)\text{-}\log(v)$, ktorá je znázornená na obrázku 28C (MLX) a môže byť popísaná rovnicou

(10) s príslušným korelačným koeficientom. Pri týchto závislostiach sa sústreďujeme na hodnotu smernice odpovedajúcej rovnice. Ak sa jej hodnota blíži 1, ide o adsorpciou riadenú reakciu, v prípade že sa blíži 0,5, ide o difúzne riadenú reakciu a ak by bola smernica blízka hodnote 0, riadiacim dejom je kinetika predchádzajúcich alebo nasledovných reakcií. Hodnota smernice logaritmickej závislosti pre MLX v prostredí BRB o pH 3 ($0,368 \pm 0,011$) sa pohybuje medzi hodnotami 0 a 0,5, čo znamená, že dej je významne ovplyvnený jak difúziou tak kinetikou.

$$\log(I_p \text{ [nA]}) = (0,368 \pm 0,011) \log(v \text{ [mV s}^{-1}\text{]}) + (2,030 \pm 0,028),$$

$$r = 0,996$$

(10)



Obrázok 28 Závislosť I_p na v (A), I_p na $v^{1/2}$ (B) a logaritmická závislosť $\log(I_p)$ na $\log(v)$ (C) získané pre MLX na BDDE; Metóda CV, elektrolyt: BRB (pH 3), $E_{poč} = -500$ mV, $E_{obratu} = +2000$ mV, $v = 50-450$ mV s⁻¹, $c_{MLX} = 1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹

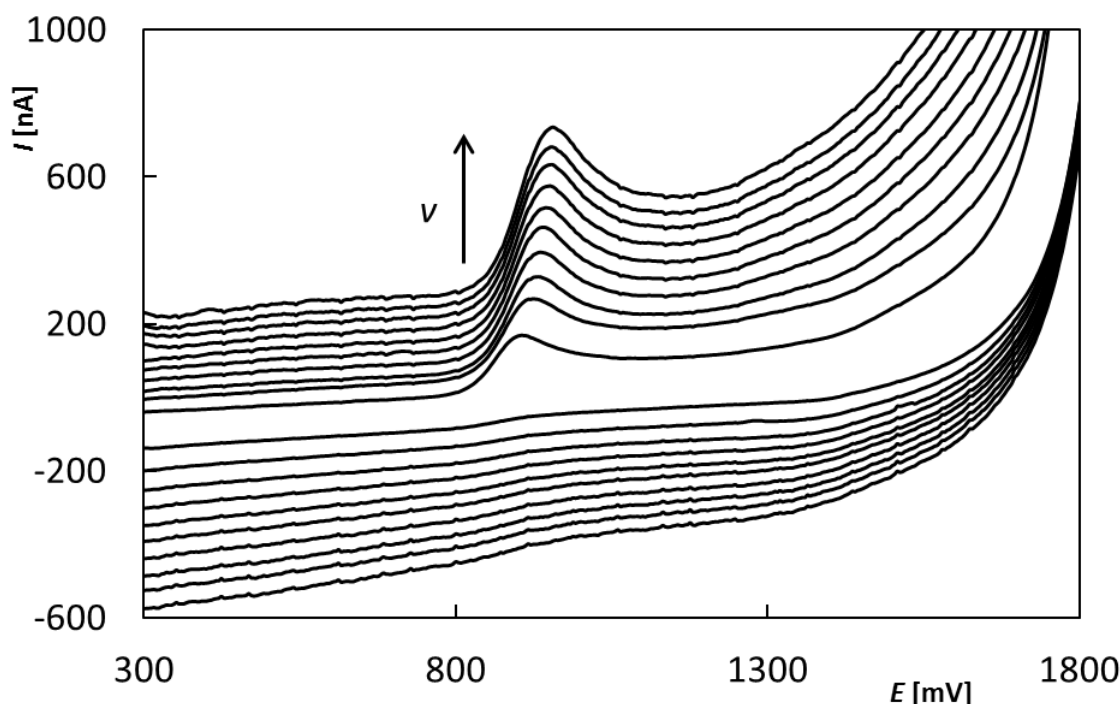
Pri sledovaní závislosti voltampérometrického správania LRX na rýchlosti polarizácie som pracovala s koncentráciou 5×10^{-5} mol L⁻¹. Použitá bola opäť metóda CV v rozsahu

potenciálov -500 mV až $+2000$ mV a v bola menená po 50 mV s⁻¹ v rozmedzí 50 - 500 mV s⁻¹. Z obr. 29 vyplýva, že so zvyšujúcou sa rýchlosťou polarizácie pík LRX narastá a súčasne sa posúva smerom k pozitívnejším hodnotám potenciálu, čo odpovedá ireverzibilnému priebehu elektródovej reakcie. V obrázku 30A je vynesená závislosť I_p na v , kde I_p nerastie celkom lineárne s rastúcou rýchlosťou polarizácie, takže môžeme prísť k záveru, že aj pri LRX nie sú sledované elektródové reakcie riadené adsorpciou. Závislosť I_p na $v^{1/2}$ na obrázku 30B vykazuje pomerne lineárny tvar ($r = 0,989$) a môže byť popísaná rovnicou (11). Logaritmickej závislosti $\log(I_p)$ _log(v) pre LRX je znázornená na obrázku 30C a odpovedá jej rovnica (12). Z týchto závislostí vyplýva, že reakcia je pravdepodobne riadená difúziou s vplyvom kinetiky prípadne predradené alebo nasledovné reakcie. Výsledky získané pre oba študované analyty sú veľmi podobné.

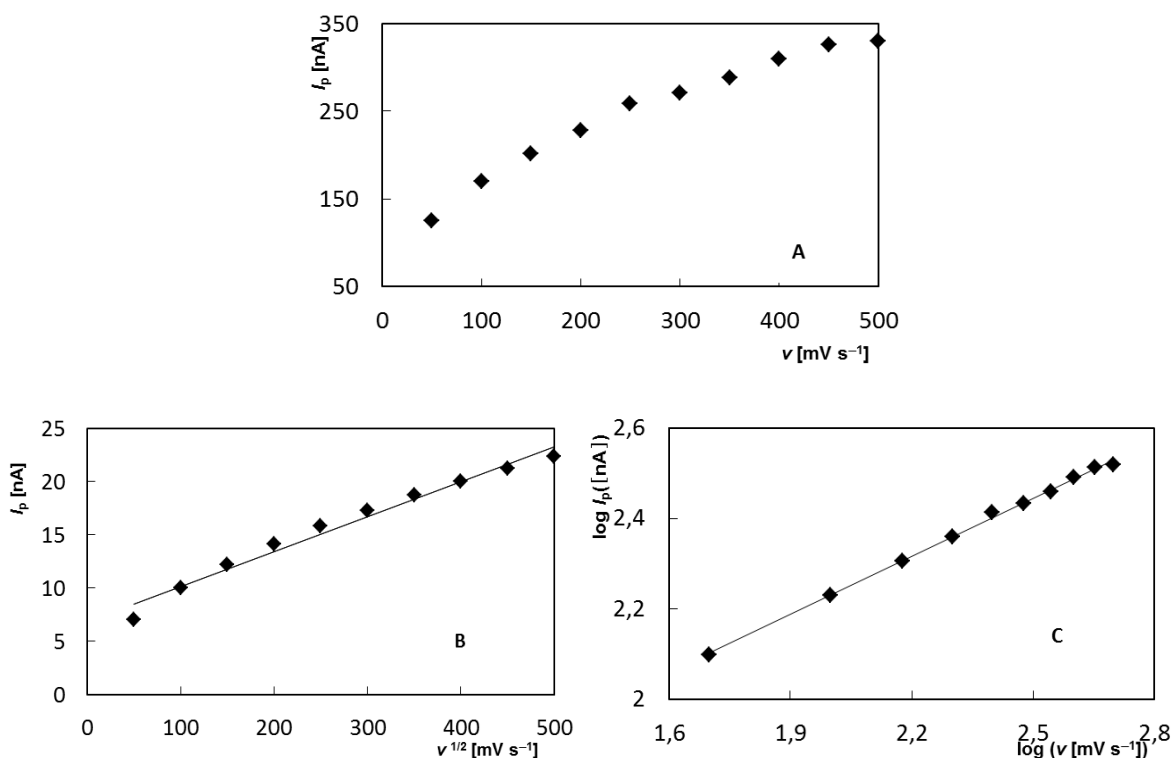
$$I_p [\text{nA}] = (0,0327 \pm 0,0017) (v [\text{mV s}^{-1}])^{1/2} + (6,89 \pm 0,53), \quad r = 0,989 \quad (11)$$

$$\log(I_p [\text{nA}]) = (0,4269 \pm 0,0064) \log(v [\text{mV s}^{-1}]) + (1,377 \pm 0,015),$$

$$r = 0,999 \quad (12)$$



Obrázok 29 Cyklické voltampérogramy LRX v závislosti na rýchlosti polarizácie zaznamenané na BDDE; Metóda CV, elektrolyt: BRB (pH 3), $E_{poč} = -500$ mV, $E_{obratu} = +2000$ mV, $v = 50$ - 500 mV s⁻¹, $c_{LRX} = 5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹;



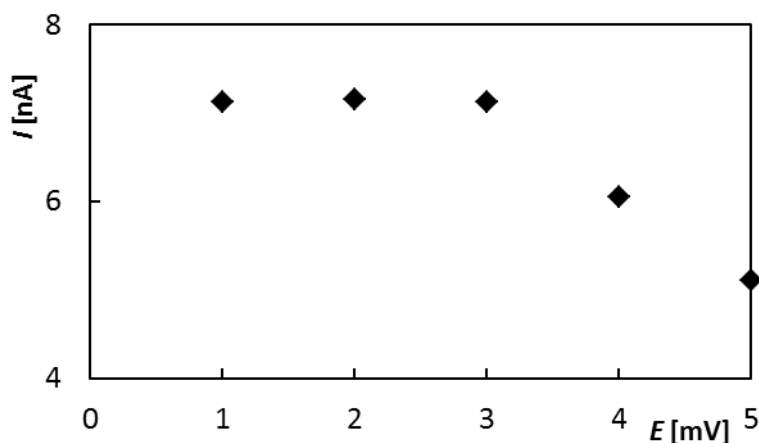
Obrázok 30 Závislosť I_p na v (A), I_p na $v^{1/2}$ (B) a logaritmická závislosť $\log(I_p)$ na $\log(v)$ (C) získané pre LRX na BDDE; Metóda CV, elektrolyt: BRB (pH 3), $E_{poč} = -500$ mV, $E_{obratu} = +2000$ mV, $v = 50-500$ mV s⁻¹, $c_{LRX} = 5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹

3.2 Vývoj metód voltampérometrického stanovenia MLX a LRX

3.2.1 Optimalizácia parametrov diferénčne pulznej voltampérometrie

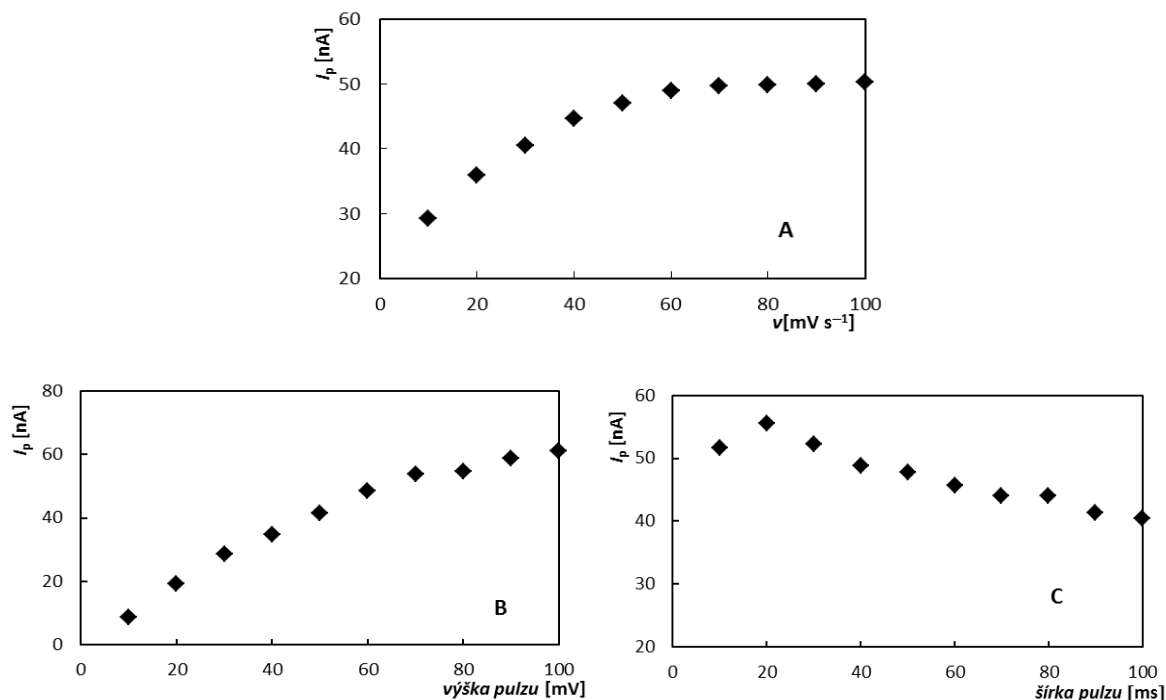
Pre vývoj metódy stanovení MLX a LRX bola zvolená DPV, ktorá je určená na sledovanie nižších koncentrácií analytov ako metóda CV. Na začiatku bola pozornosť venovaná overeniu voľby základného elektrolytu. Zatiaľ čo pre MLX bolo na základe CV meraní zvolené prostredie BRB o pH 3, pre LRX sa zdalo vhodnejšie kyslejšie prostredie 0,1 mol L⁻¹ HNO₃. Vzhľadom k tomu, že pre ďalšie oxikámy (piroxikám a tenoxikám) sa v rámci súbežne realizovaných predbežných štúdií javilo optimálnym rovnako slabé kyslé prostredie (pH 3), bola zopakovaná štúdia vplyvu pH prostredia na oxidáciu LRX metódou DPV. Testované boli iba kyslé hodnoty pH. Na obr. 31 je uvedená získaná závislosť I_p na pH. Parametre metódy sú uvedené pod obrázkom. Z obrázku vyplýva, že v kyslom až slabom kyslom prostredí poskytoval LRX porovnateľný signál, ktorý pri pH 4 začal klesať. Tento

priebeh závislosti odpovedal výsledkom dosiahnutým v predchádzajúcich experimentoch pre MLX i v súbežne realizovaných štúdiách pre ostatné oxikámy. BRB o pH 3 je teda vhodným prostredím nie len pre stanovenie MLX, ale aj pre ďalšie analýzy týkajúce sa LRX. Preto bol BRB (pH 3) využívaný vo všetkých nasledujúcich experimentoch vedúcich k vývoju metód pre voltampérometrické stanovenie obidvoch liečiv.



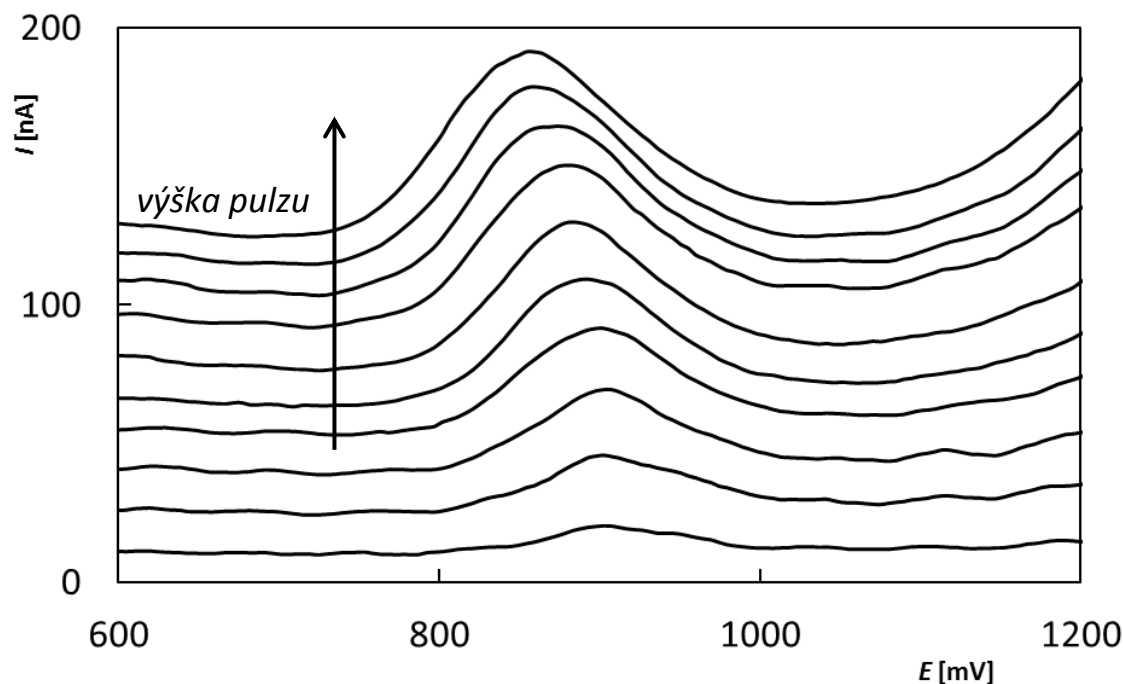
Obrázok 31 Závislosť I_p LRX na pH základného elektrolytu; Metóda DPV, elektrolyt: $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$, BRB (pH 2-5), $E_{poč} = 0 \text{ mV}$, $E_{kon} = +2000 \text{ mV}$, $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$, výška pulzu = $+50 \text{ mV}$, šírka pulzu = 50 ms , $c_{MLX} = 1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$

Všetky nasledujúce merania prebiehali v prostredí BRB o pH 3. Boli vykonané optimalizácie základných parametrov DPV ako sú rýchlosť polarizácie, šírka a výška napäťového pulzu. Koncentrácia MLX v roztoku bola pre tieto experimenty $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Meranie prebiehalo v rozsahu potenciálov od $E_{poč}$ 0 mV do E_{kon} +2000 mV. Prvým testovaným parametrom bola ν (obr. 32A), ktorá bola menená po 10 mV s^{-1} v rozmedzí 10-100 mV s^{-1} . Ďalšie parametre, teda šírka a výška pulzu boli pritom udržiavané v konštantných hodnotách (výška pulzu = $+50 \text{ mV}$ a šírka pulzu = 50 ms). Bolo zistené, že I_p narastá s rýchlosťou významne do 40 mV s^{-1} , potom sa nárast spomaľuje a od 60 mV s^{-1} sa už výška prúdového signálu významne nemení. Pre nasledujúce meranie bola preto ako optimálna zvolená rýchlosť 40 mV s^{-1} .



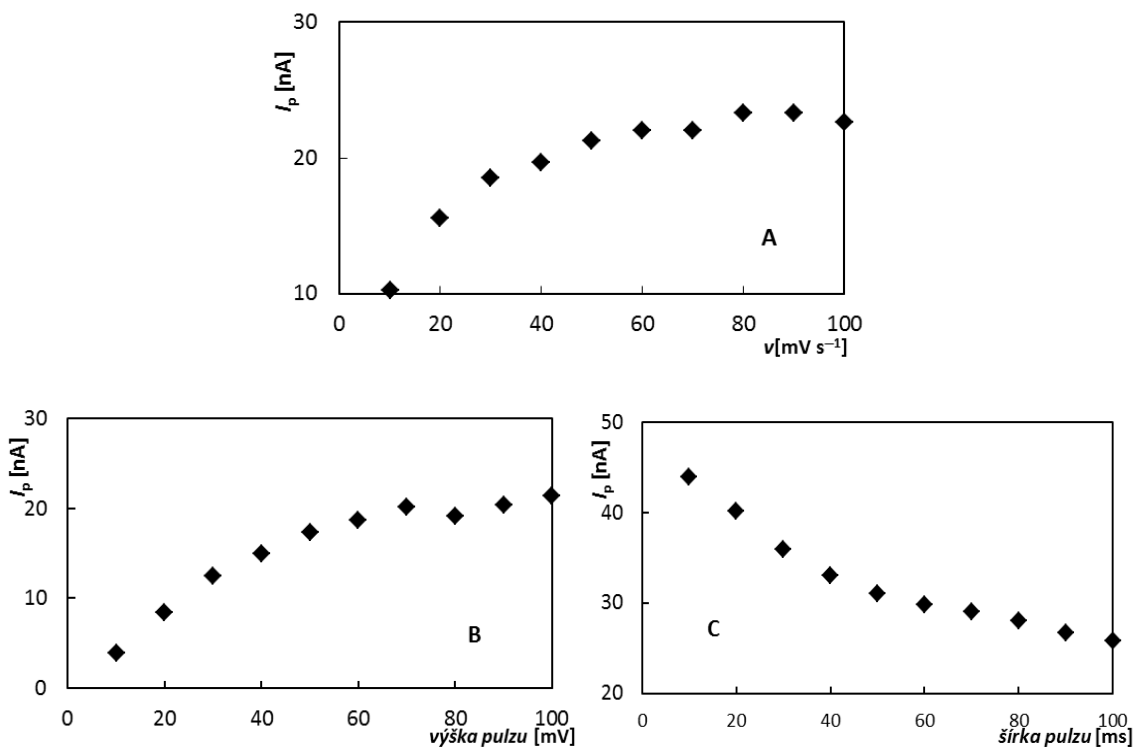
Obrázok 32 Závislosť I_p na v (A), výške pulzu (B) a šírke pulzu (C) získané pre MLX na BDDE; Metóda DPV, elektrolyt: BRB (pH3), $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 10$ -100 mV s⁻¹ (A), 40 mV s⁻¹ (B, C), výška pulzu = +50 mV (A), +10-+100 mV (B), +60 mV (C), šírka pulzu = 50 ms (A, B), 10-100 ms (C), $c_{MLX} = 5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹

Ďalším sledovaným parametrom bola výška pulzu, ktorá bola menená v rozmedzí od 10 do 100 mV ($v = 40$ mV s⁻¹, šírka pulzu = 50 ms). Na obr. 33 sú uvedené voltampérogramy MLX zaznamenané na BDDE v závislosti na výške pulzu. Je evidentné, že pík s rastúcou výškou pulzu narastá a s ním aj prúdová odozva na obr. 32B, a to až do hodnoty +70 mV. S rastúcou výškou pulzu sa zvyšuje pozadí a píky sa viac rozširujú. Nad uvedenú hodnotu už nie je nárast píku tak evidentný. Pre ďalšie merania bola ako kompromis medzi výškou a tvarom signálu nastavená výška pulzu +60 mV. Posledným testovaným parametrom bola šírka pulzu, ktorá bola menená po 10 ms v rozmedzí od 10 do 100 ms ($v = 40$ mV s⁻¹, výška pulzu = +60 mV). Zo závislosti uvedenej na obr. 32C vidíme od hodnoty 20 ms pozvoľne klesajúci charakter odozvy. Pre ďalšie merania bola zvolená šírka pulzu 30 ms a to nie len s ohľadom na výšku, ale aj na tvar získanej voltampérometrickej odozvy.



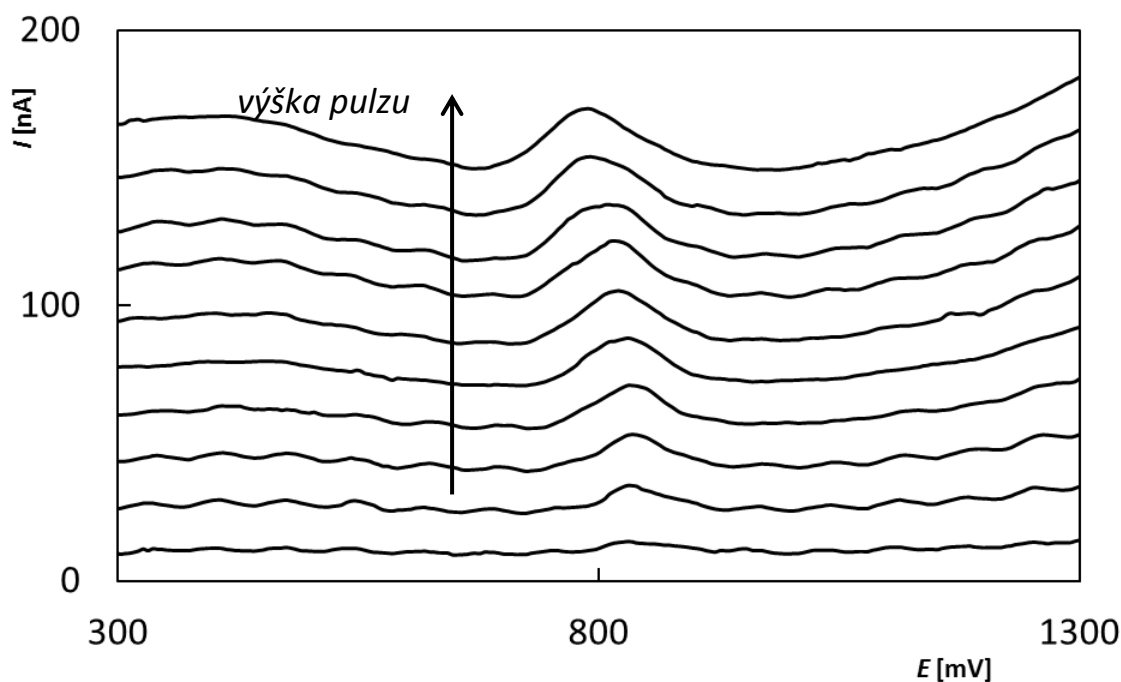
Obrázok 33 DP voltampérogramy MLX v závislosti na výške pulzu zaznamenané na BDDE; Metóda: DPV, elektrolyt: BRB (pH 3), $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV s⁻¹, výška pulzu = +10-+100 mV, šírka pulzu = 50 ms, $c_{MLX} = 5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹

Koncentrácia LRX v roztoku bola pre optimalizačné experimenty rovnaká ako pre MLX, konkrétne 5×10^{-6} mol L⁻¹. Meranie prebiehalo v prostredí BRB o pH 3 v rozsahu potenciálov od $E_{poč}$ 0 mV do E_{kon} +2000 mV. Prvým testovaným parametrom bola obdobne ako pri MLX v (obr. 34A), ktorá bola menená po 10 mV s⁻¹ v rozmedzí 10 - 100 mV s⁻¹. Ďalšie parametre, teda šírka a výška pulzu boli udržiavané v konštantných hodnotách (výška pulzu = +50 mV a šírka pulzu = 50 ms). Z grafu je zrejmé, že hodnota I_p narastá s rýchlosťou do 50 mV s⁻¹ a od rýchlosti 60 mV s⁻¹ sa už význačne nemení. Rovnako ako pri MLX bola pre stanovenie LRX vzhľadom k výške i tvaru sledovaného prúdového signálu zvolená rýchlosť polarizácie 40 mV s⁻¹.



Obrázok 34 Závislosť I_p na v (A), výške pulzu (B) a šírke pulzu (C) získané pre LRX na BDDE; Metóda DPV, elektrolyt: BRB (pH3), $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 10-100$ mV s⁻¹ (A), 40 mV s⁻¹ (B, C), výška pulzu = +50 mV (A), +10-+100 mV (B), +60 mV (C), šírka pulzu = 20 ms (A, B), 10-100 ms (C), $c_{MLX} = 5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹

Ďalším sledovaným parametrom bola výška pulzu, ktorá bola menená v rozmedzí od +10 do +100 mV ($v = 40$ mV s⁻¹, šírka pulzu = 50 ms). Na obr. 35 sú uvedené voltampérogramy LRX zaznamenané na BDDE v závislosti na výške pulzu. Zreteľne vidíme, že pík s rastúcou výškou pulzu narastá a s ním aj prúdová odozva na obr. 34B až do hodnoty +70 mV. Nad túto hodnotu sa už pík LRX nezväčšuje. So zvyšujúcou sa výškou pulzu rastie pozadie a píky sa rozširujú. Po zhodnotení tvaru a výšky signálu bola pre nasledujúce merania vybraná výška pulzu +60 mV. Šírka pulzu bola posledným testovaným parametrom a bola menená po 10 ms v rozmedzí od 10 do 100 ms ($v = 40$ mV s⁻¹, výška pulzu = +60 mV). Zo závislosti uvedenej na obr. 34C vidíme postupne klesajúci charakter odozvy. Pre ďalšie merania bola zvolená šírka pulzu 30 ms, kedy bol signál dostatočne vysoký a súčasne dobre vyhodnotiteľný.



Obrázok 35 DP voltampérogramy LRX v závislosti na výške pulzu zaznamenané na BDDE; Metóda: DPV, elektrolyt: BRB (pH 3), $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV s⁻¹, výška pulzu = +10-+100 mV, šírka pulzu = 50 ms, $c_{LRX} = 5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹

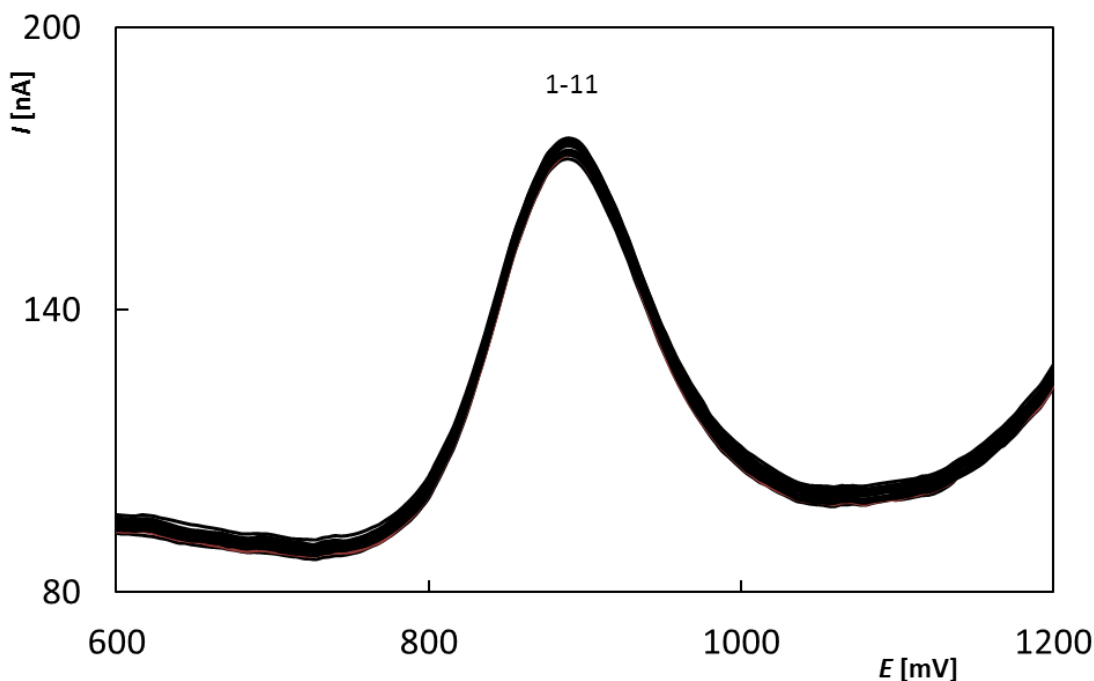
Na základe vyššie popísaných experimentov boli nastavené parametre DPV pre oba analyty zhodne, a to rýchlosť polarizácie 40 mV s⁻¹, výška pulzu +60 mV a šírka pulzu 30 ms. Ďalším krokom optimalizácie metódy je zvyčajne štúdium vplyvu predúpravy elektródy na merané signály. Testuje sa vloženie katodického alebo anodického pretreatmentu, cyklovanie v určitom rozsahu potenciálov a často aj leštenie povrchu elektródy pred meraním.

U vyššie popísaných experimentov bola využitá aktivácia elektródy na začiatku meraní cyklovaním, teda premeraním 20 cyklických voltampérogramov v prostredí základného elektrolytu v rozsahu potenciálov -1000 až +2200 mV. Na základe predchádzajúcich skúseností na pracovisku bol tento postup zachovaný a bola overená opakovateľnosť meraní MLX aj LRX. Nameralo sa vždy 11 opakovaných kriviek pri koncentrácii 5×10^{-6} mol L⁻¹ pre MLX aj LRX v polarografickej nádobke. Na obr. 36 (MLX) a 37 (LRX) sú prezentované získané voltampérogramy. Z obrázkov je zrejmé, že sa signály veľmi dobre opakovali a ich výška sa významne nemenila. Boli vyhodnotené hodnoty I_p pre obe látky a vypočítané relatívne smerodajné odchýlky (RSD_{11}), ktoré sú uvedené v tabuľke 2.

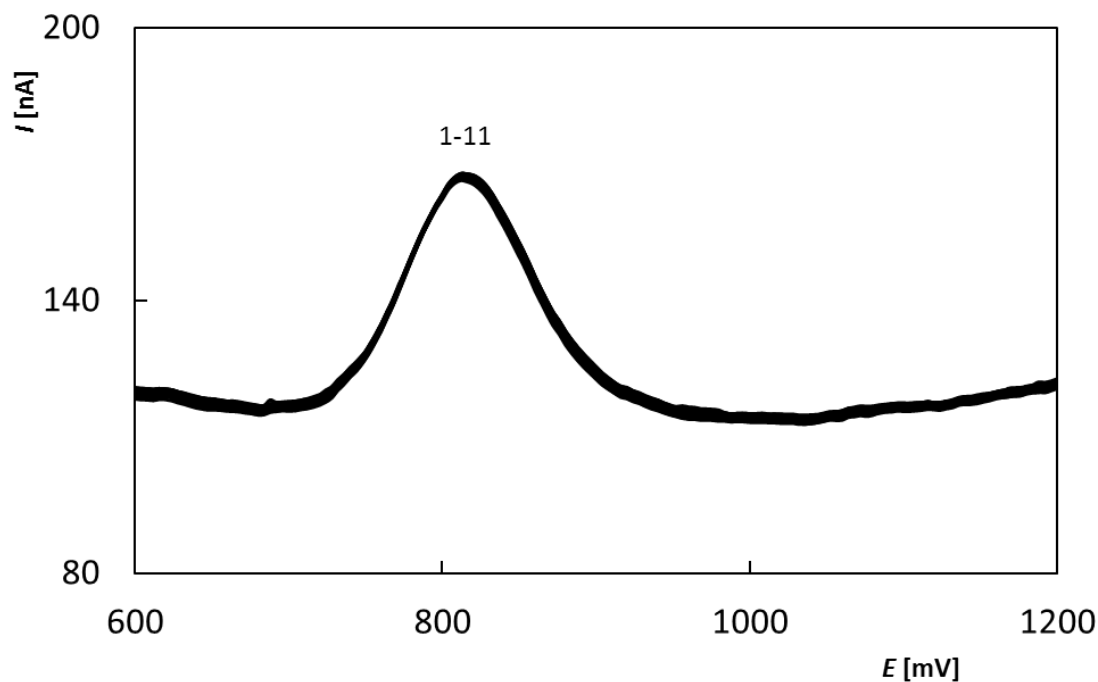
Hodnoty sa pohybovali pod 1%, čo svedčí o veľmi dobrej opakovateľnosti merania. Ukázalo sa, že nastavené parametre DPV sú vhodné pre stanovenie MLX aj LRX a že nie je nutné elektródu medzi jednotlivými meraniami nijako regenerovať, pretože nedochádza k jej pasivácii.

Tabuľka 2 Výsledky opakovaných meraní MLX a LRX metódou DPV v kombinácii s BDDE

	c [mol L ⁻¹]	I_p [nA]	RSD_{11} [%]
MLX	5×10^{-6}	(79,64±0,16)	0,30
LRX	5×10^{-6}	(51,18±0,17)	0,50



Obrázok 36 DP voltampérogramy 11 opakovaných meraní MLX na BDDE pri nastavených optimálnych podmienkach; Metóda: DPV, elektrolyt: BRB (pH 3), $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV s⁻¹, výška pulzu = +60 mV, šírka pulzu = 30 ms, $c_{MLX} = 5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹

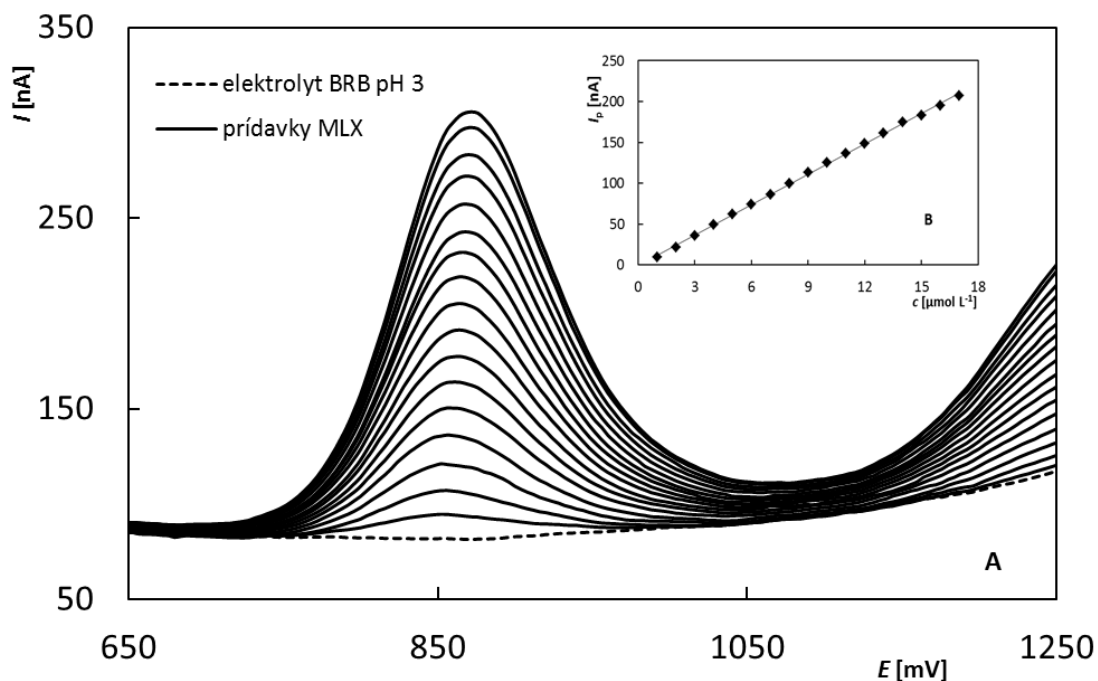


Obrázok 37 DP voltampérogramy 11 opakovaných meraní LRX na BDDE pri nastavených optimálnych podmienkach; Metóda: DPV, elektrolyt: BRB (pH 3), $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV s⁻¹, výška pulzu = +60 mV, šírka pulzu = 30 ms, $c_{LRX} = 5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹

3.2.2 Analýza modelových roztokov

S využitím nových metód vyvinutých pre stanovenie MLX a LRX boli analyzované modelové roztoky o rôznych koncentráciách analytov s cieľom zistiť využiteľný koncentračný rozsah. Merania prebiehali v prostredí BRB pufru o pH 3 a s nastavenými optimalizovanými parametrami. Najskôr boli premerané rôzne koncentračné závislosti pre obe liečiva. Na obr. 38 je uvedený príklad voltampérogramov pre MLX v závislosti na koncentrácii v rozsahu 1×10^{-6} až $1,7 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Vložená závislosť I_p na c narastá lineárne a môže byť popísaná rovnicou (13) s odpovedajúcim korelačným koeficientom. Zo všetkých zmeraných koncentračných závislostí pre MLX bol určený veľmi široký lineárny dynamický rozsah (LDR) navrhnuté metódy pre stanovenie tohto liečiva od $2,5 \times 10^{-7}$ do $8,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Z najnižší namerané lineárne koncentračné závislosti pre MLX ($2,5 \times 10^{-7}$ - $1,25 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, $r = 0,999$) boli vypočítané hodnoty LOD a LOQ, ktoré sú uvedené v nasledujúcej tabuľke 3.

$$I_p \text{ [nA]} = (12,37 \pm 0,089)(c \text{ [\mu mol L}^{-1}\text{]}) - (0,64 \pm 0,91), r = 0,9995 \quad (13)$$



Obrázok 38 DP voltampérogramy MLX v závislosti na koncentrácii zaznamenané na BDDE (A) a závislosť I_p na c_{MLX} (B); Metóda DPV, elektrolyt: BRB (pH 3), $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV s⁻¹, výška pulzu = +60 mV, šírka pulzu = 30 ms, $c_{MLX} = 1 \times 10^{-6}$ - $1,7 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹

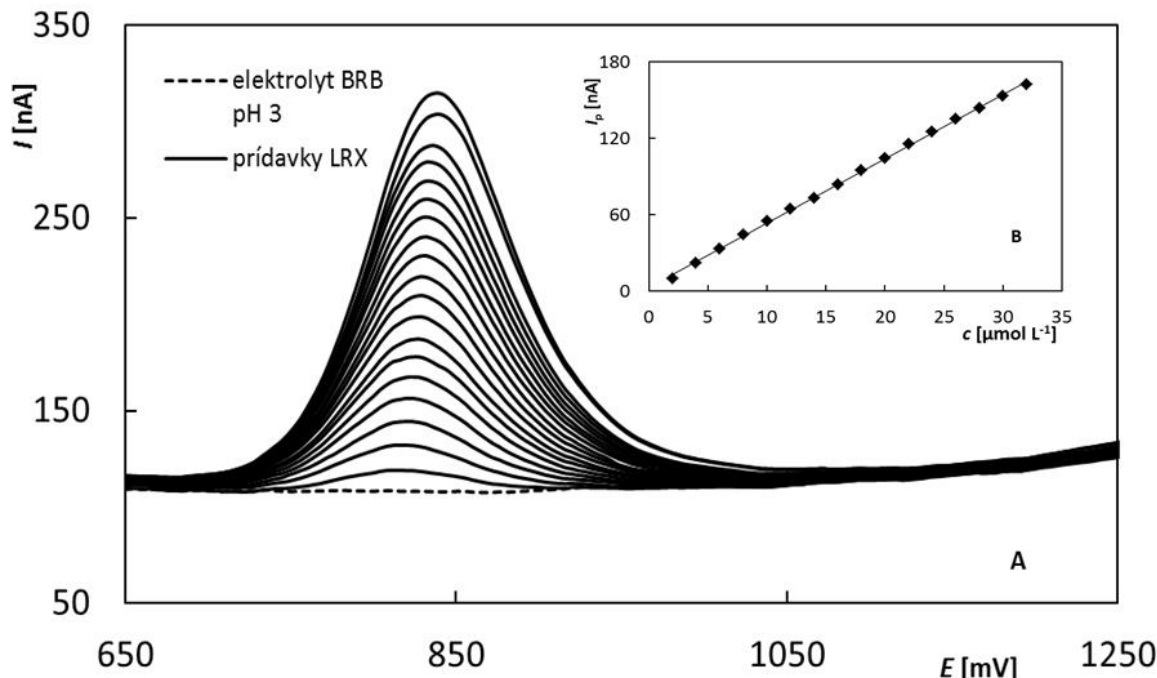
Tabuľka 3 Limity detekcie a medze stanoviteľnosti pre MLX a LRX v modelovom roztoku s využitím DPV v kombinácii s BDDE

	LOD [mol L ⁻¹]	LOQ [mol L ⁻¹]
MLX	$5,9 \times 10^{-8}$	$1,9 \times 10^{-7}$
LRX	$1,2 \times 10^{-7}$	$3,9 \times 10^{-7}$

Meranie koncentračných závislostí pre LRX prebiehalo pri rovnakých podmienkach ako v prípade MLX a cieľom bolo opäť určení *LDR* pre vyvinutú metódu. Na obr. 39 je uvedený príklad voltampérogramov pre LRX v závislosti na koncentrácii v rozsahu 2×10^{-6} - $3,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Z vlozenej závislosti I_p na c vyplýva, že prúdová odozva narastá lineárne s rastúcou koncentráciou analytu v roztoku. Tato závislosť môže byť charakterizovaná rovnicou 14 s príslušným korelačným koeficientom. Zo všetkých zmeraných koncentračných závislostí pre LRX bol určený *LDR* navrhutej metódy pre stanovenie tohto liečiva od 5×10^{-7} do 8×10^{-5} mol L⁻¹. V tabuľke 3 sú uvedené hodnoty LOD a LOQ vypočítané

z koncentračnej závislosti zmerané v rozsahu koncentrácií LRX od 5×10^{-7} do 3×10^{-6} mol L⁻¹ ($r = 0,998$).

$$I_p [\text{nA}] = (5,055 \pm 0,037)(c [\mu\text{mol L}^{-1}]) + (2,88 \pm 0,72), r = 0,9992 \quad (14)$$

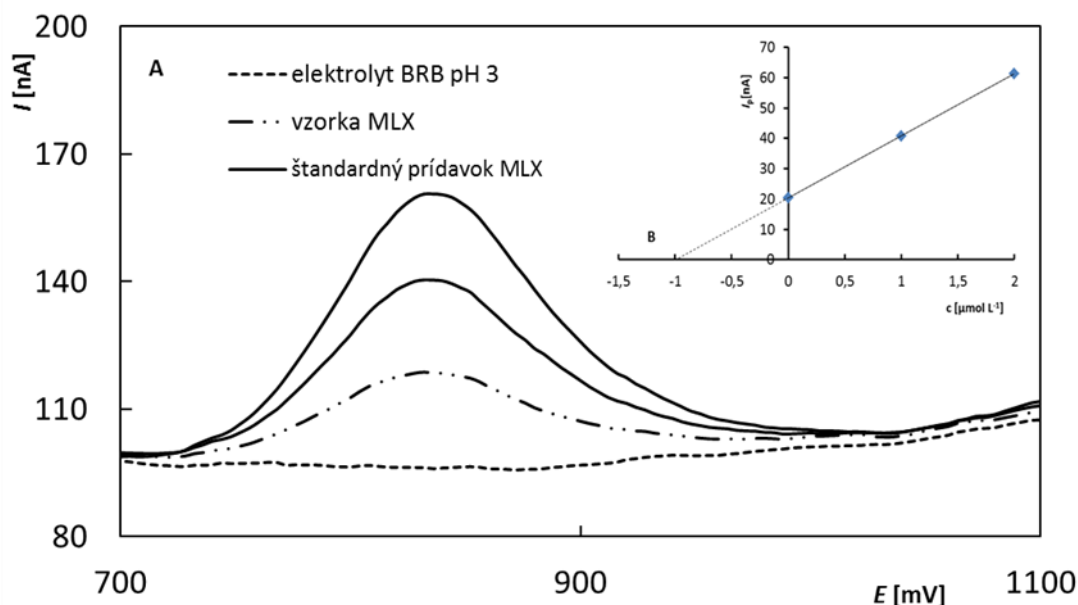


Obrázok 39 DP voltampérogramy LRX v závislosti na koncentrácii zaznamenané na BDDE (A) a závislosť I_p na c_{LRX} (B); Metóda DPV, elektrolyt: BRB (pH 3), $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV s⁻¹, výška pulzu = +60 mV, šírka pulzu = 30 ms, $c_{LRX} = 2 \times 10^{-6} - 3,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹

Na záver kapitoly týkajúce sa analýzy modelových roztokov bola otestovaná opakovateľnosť stanovenia koncentrácie oboch oxikámov v modelových roztokoch pomocou vyvinuté metódy s využitím DPV v kombinácii s BDDE. Stanovenie MLX aj LRX prebiehalo v polarografickej nádobke v objemu 15 mL BRB (pH 3) pri koncentrácii analytov 1×10^{-6} mol L⁻¹. Bola použitá metóda štandardného prídavku, kedy boli pridané pre MLX aj LRX vždy 2 štandardné prídavky o objeme 75 μL štandardného roztoku a koncentrácii 1×10^{-3} mol L⁻¹.

Dosiahnuté výsledky sú zhrnuté v tabuľke 4. Príklady realizovaných analýz modelových roztokov vrátane grafického vyhodnotenia metódy štandardného prídavku sú uvedené pre MLX na obr. 40 a pre LRX na obr. 41. Zo získaných dát (tabuľka 4) vyplýva, že navrhnuté metódy sa vyznačujú veľmi dobrou opakovateľnosťou vzhľadom na hodnotu

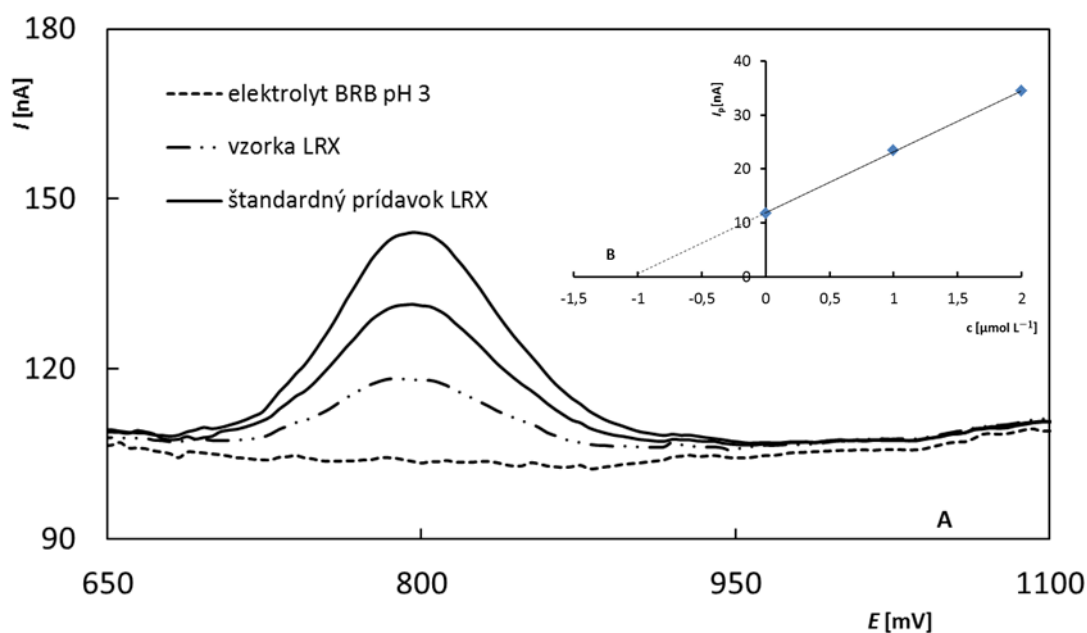
RSD_5 , ktorá sa u oboch liečiv pohybuje do 3 %, a umožňujú zisk správnych a presných výsledkov.



Obrázok 40 Stanovenie MLX v modelovom roztoku o koncentrácii $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ metódou štandardného prídavku s využitím BDDE (A) a grafické vyhodnotení metódy štandardného prídavku (B); Metóda DPV, elektrolyt: BRB (pH 3), $E_{poč} = 0 \text{ mV}$, $E_{kon} = +2000 \text{ mV}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$, výška pulzu = $+60 \text{ mV}$, šírka pulzu = 30 ms , štandardný prídavok: $V = 75 \text{ μL}$, $c_{MLX} = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

Tabuľka 4 Výsledky opakovaného stanovenia MLX a LRX v modelovom roztoku metódou štandardného prídavku s využitím BDDE

	$c \text{ [mol L}^{-1}\text{]}$	Stanovené $\text{[mol L}^{-1}\text{]}$	Výtťažnosť [%]	$RSD_5 \text{ [%]}$
MLX	1×10^{-6}	$(0,98 \pm 0,014) \times 10^{-7}$	97-101	2,11
LRX	1×10^{-6}	$(0,99 \pm 0,015) \times 10^{-7}$	97-103	2,32



Obrázok 41 Stanovení LRX v modelovom roztoku o koncentrácii $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ metódou štandardného prídavku s využitím BDDE (A) a grafické vyhodnotení metódy štandardného prídavku (B); Metóda DPV, elektrolyt: BRB (pH 3), $E_{\text{poč}} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{kon}} = +2000 \text{ mV}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$, výška pulzu = $+60 \text{ mV}$, šírka pulzu = 30 ms , štandardný prídavok: $V = 75 \mu\text{L}$, $c_{\text{LRX}} = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

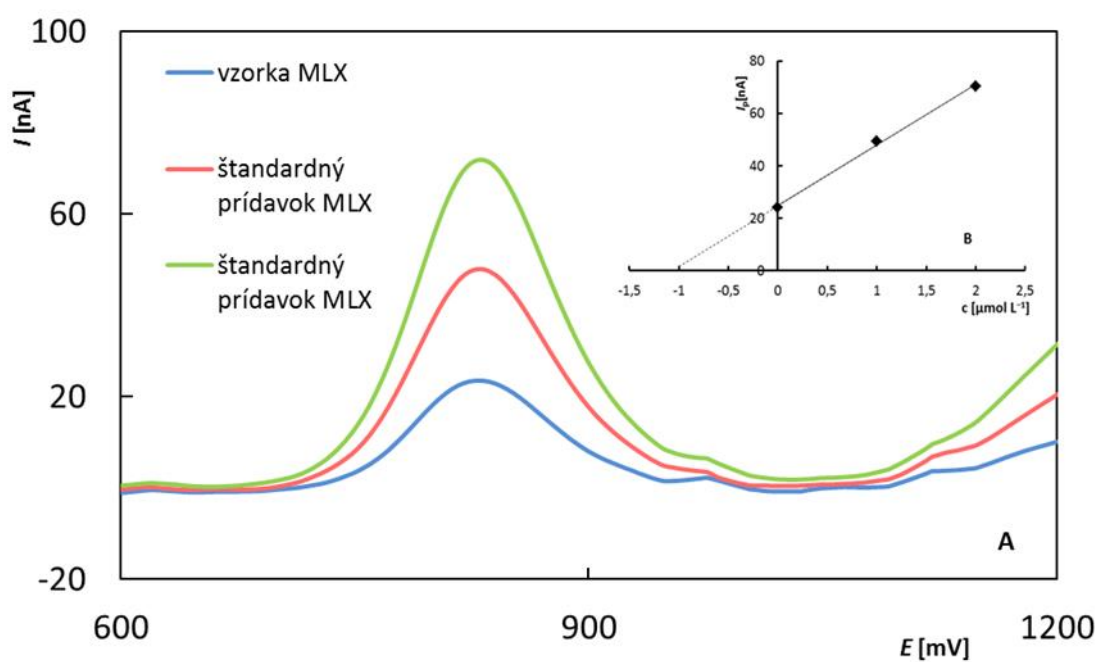
3.2.3 Analýza farmaceutických prípravkov

V poslednej kapitole som sa venovala analýze farmaceutických prípravkov obsahujúcich meloxicám a lornoxikám ako účinné látky s využitím DPV v kombinácii s BDDE. Týmito vzorkami boli prípravky Meloxicam Mylan (MLX, 15 mg) a Xefo Rapid (LRX, 8 mg) uvedené na obr. 42. Stanovenie MLX aj LRX prebiehalo v polarografickej nádobke pri koncentrácii analytov okolo $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Táto koncentrácia bola vypočítaná na základe postupu prípravy roztokov vzoriek a výrobcom deklarovaného množstva účinných látok na 1 tabletu prípravkov. Bola použitá metóda štandardného prídavku vždy so 2 prídavkami štandardných roztokov, a konkrétny postup stanovení pre obidve liečivá je uvedený v experimentálnej časti. Stanovenie oxikámov bolo vždy vykonané 5×, a následne bol vypočítaný priemerný obsah MLX a LRX na tabletu s príslušným intervalom spoľahlivosti, výťažnosti a RSD_5 . Dosiahnuté výsledky sú zhrnuté v tabuľke 5. Príklady realizovaných analýz farmaceutických prípravkov vrátane grafického vyhodnotenia metódy

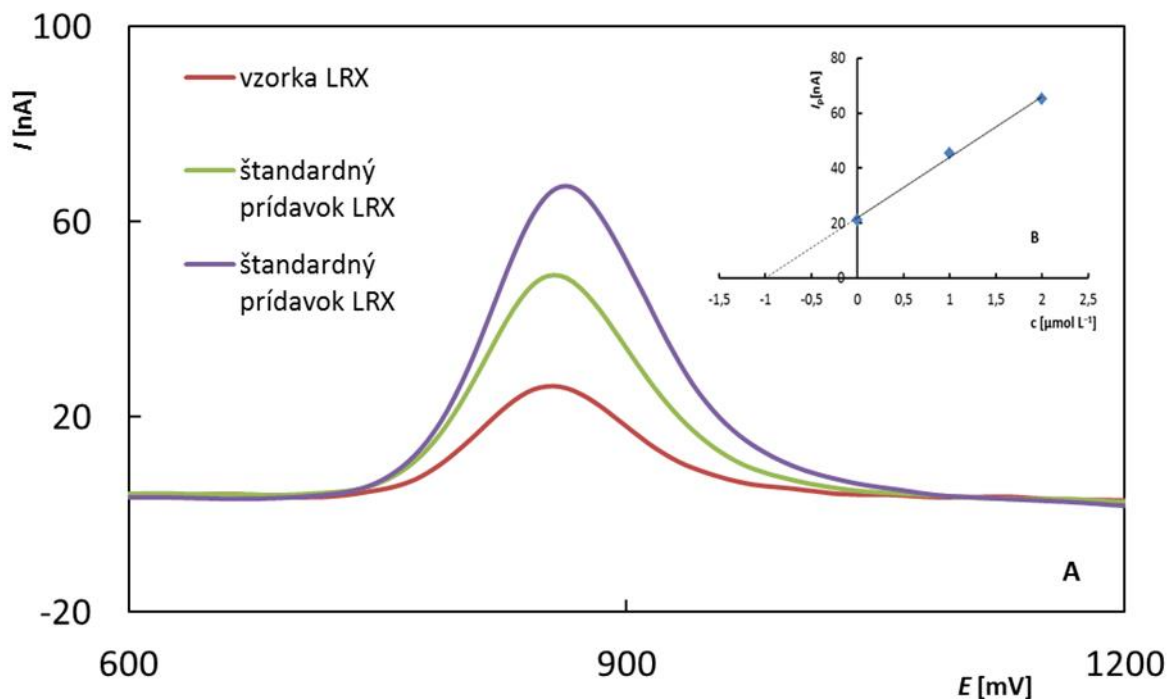
štandardného prídavku sú pre MLX uvedené na obr. 43 a pre LRX na obr. 44. Parametre použitej metódy sú uvedené v popisoch pod obrázkami.



Obrázok 42 Analyzované farmaceutické prípravky Meloxicam Mylan a Xefo Rapid



Obrázok 43 Stanovenie MLX vo farmaceutickom prípravku metódou štandardného prídavku s využitím DDDE (A) a grafické vyhodnotenie metódy štandardného prídavku (B); Metóda DPV, elektrolyt: BRB (pH 3, $V = 15 \text{ mL} + 35 \mu\text{L}$ roztoku tablety), $E_{poč} = 0 \text{ mV}$, $E_{kon} = +2000 \text{ mV}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$, výška pulzu = $+60 \text{ mV}$, šírka pulzu = 30 ms , štandardný prídavok: $V = 15 \mu\text{L}$, $c_{LRX} = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; voltampérogramy uvedené po korekcii základnej línie



Obrázok 44 Stanovenie LRX vo farmaceutickom prípravku metódou štandardného prídavku s využitím BDDE (A) a grafické vyhodnotení metódy štandardného prídavku (B); Metóda DPV, elektrolyt: BRB (pH 3, $V = 20 \text{ mL} + 93 \text{ } \mu\text{L}$ roztoku tablety), $E_{poč} = 0 \text{ mV}$, $E_{kon} = +2000 \text{ mV}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$, výška pulzu = $+60 \text{ mV}$, šírka pulzu = 30 ms , štandardný prídavok: $V = 20 \text{ } \mu\text{L}$, $c_{LRX} = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; voltampérogramy uvedené po korekcii základní línie

Z výsledkov zhrnutých v tabuľke 5 vyplýva, že dosiahnuté výsledky sú správne (odpovedajú výrobcem deklaroványm hodnotám) a presné pre obidve analyzované liečiva. Výsledky RSD_5 v intervale do 3 % svedčia aj o veľmi dobre opakovateľnom stanovení. Vďaka týmto výsledkom je možné povedať, že BDDE v kombinácii s DPV sa osvedčila ako vhodný nástroj k stanoveniu MLX a LRX vo farmaceutických prípravkoch.

Tabuľka 5 Výsledky opakovaného stanovenia MLX a LRX vo farmaceutických prípravkoch s využitím DPV vo spojení s BDDE

	Deklarované [mg/Tbl]	Stanovené [mg/Tbl]	Výtťažnosť [%]	RSD_5 [%]
MLX	15	15,25±0,26	98,1-103,8	2,06
LRX	8	8,06±0,12	98,6-103,6	2,33

4 Záver

Cieľom diplomovej práce bolo štúdium voltampérometrického správania liečiv meloxicámu a lornoxicámu na bórom dopovanej diamantovej elektróde a vývoj metód ich stanovenia. BDD elektróda bola pre túto prácu zvolená vďaka jej elektrochemickej a mechanickej stabilite a jej ponuke širokého využiteľného potenciálového rozsahu, ktorý umožňuje meraní pri značne pozitívnych hodnotách potenciálu.

Na začiatku praktickej časti diplomovej práce som sa zamerala na štúdium voltampérometrického správania oxikámov na BDDE. Pomocou CV bolo zistené, že MLX poskytuje dva oxidačné signály pri potenciáloch cca +900 a +1400 mV a LRX jeden oxidačný pík kolem potenciálu +900 mV. Podľa literatúry [80] by mal prvý oxidačný signál MLX odpovedať oxidácii amidovej a druhý hydroxylovej funkčnej skupiny. Na druhú stranu autori [91] prisudzujú oxidačný signál LRX oxidácii hydroxylovej skupiny. V rámci tejto štúdie ale bolo preukázané, že prvý anodický pík MLX má rovnaký potenciál ako anodický pík LRX, čo by odpovedalo oxidácii rovnakej funkčnej skupiny. Štúdiu oxidačného mechanizmu oxikámov by tak mala byť venovaná pozornosť aj v budúcnosti, aby boli tieto nezrovnalosti vyjasnené. Optimálnym prostredím pre analýzu oxikámov bolo kyslé až slabo kyslé prostredie. V zásaditejšom prostredí sa prúdové odozvy MLX i LRX znižovali až vymizli. Z toho dôvodu som zvolila kyslé prostredie BRB (pH 3) ako vhodné pre vývoj metódy stanovenia študovaných liečiv.

Druhá časť diplomovej práce bola zameraná na vývoj voltampérometrických metód stanovení MLX a LRX. Vzhľadom k citlivosti bola zvolená metóda DPV a boli optimalizované jej parametre ako rýchlosť polarizácie, výška a šírka pulzu pre obidve liečiva. Po nastavení optimálnych parametrov boli premerané rôzne koncentračné závislosti v modelových roztokoch s cieľom zistiť využiteľný koncentračný rozsah metód a stanoviť základné štatistické parametre ako LOD ($5,9 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ pre MLX a $1,2 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ pre LRX) a LOQ ($1,9 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ pre MLX a $3,9 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ pre LRX). Otestovaná bola aj opakovateľnosť stanovenia analytov v modelových roztokoch. Vypočítané hodnoty $RSD_5 < 3\%$ (5×10^{-6} mol L⁻¹) svedčí o veľmi dobrej opakovateľnosti stanovenia.

Posledná kapitola práce bola venovaná analýze farmaceutických prípravkov vo forme tabliet. Pripravené roztoky boli analyzované pomocou metódy štandardného prídavku

a rovnako ako pri modelových roztokoch boli vypočítané základné štatistické parametre. Dosiiahnuté výsledky boli správne, presné a veľmi dobre opakovateľné ($RSD_5 < 3 \%$).

V závere je možné konštatovať, že cieľ diplomovej práce bol splnený. Bolo preštudované voltampérometrické správanie MLX a LRX na BDDE a boli vyvinuté metódy pre ich stanovenie, ktoré boli overené ak pri analýze modelových roztokov tak praktických vzoriek farmaceutických prípravkov.

Zoznam použitej literatúry

1. VONDRÁK D., VULTERIN J.: *Analytická chemie*, SNTL-Alfa 1985, Praha.
2. JINDRA J.: *Dějiny elektrochemie v českých zemích 1882-1989*, Libri, Praha 2009 ISBN 978-80-7277-400-5.
3. OPEKAR F.: *Základní analytická chemie*, s.208, Praha: Karolinum, 2002 ISBN 80-246-0553-8.
4. *Rozdelenie elektroanalytických metód*: Klouda, P. Moderní analytické metody, Ostrava 132 s. 2003 ISBN 80-86369-07-2.
5. *J. Heyrovský*: [online], [cit.2019-03-5] Dostupné z: <http://www.converter.cz/nobel/heyrovsky.htm>, *prvý polarograf* [online],[cit.2019-03-5] Dostupné z: <http://www.converter.cz/nobel/heyrovsky.htm>.
6. BAREK J.: *Elektroanalytická chemie*, , Praha: Karolinum, 2005 ISBN 80-246-1146-5
7. SZABO E.: *Cyklická voltametria*, Katedra fyzikálnej a teoretickej chémie, PRIF UK Bratislava, 2017.
8. BAREK J., *Elektroanalytická chémie*, Praha: Karolinum, 2005 ISBN 80-246-0553-8.
9. ZÝKA J.: *Analytická příručka*, Státní nakladatelství technické literatury, 1988 Praha.
10. *Schéma zapojenia obvodu*: BAREK J., Elektroanalytická chémie, Praha: Karolinum, 2005 ISBN 80-246-1146-5
11. ČUTA F.: *Instrumentální analýza*. SNTL, s 295, 1986 Praha.
12. KOTRLÝ S.,CHURÁČEK J.: *Analytická chémie III: elektroanalytické metody*. Vysoká škola chemicko-technologická, s.82, 1984 Pardubice.
13. PREDNÁŠKOVÝ MATERIÁL , *Biokatalytické Transducery, Elektrochemické převodníky*, Masarykova Univerzita [online],[cit.2019-03-8] Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2012/C9100/um/BSN2_Transducery_1_-_Biokatalyticke.pdf , Brno 2012.
14. ČERNÁK J., *Chémici a ich prístroje*, SPN 1981
15. *Kalomelová elektróda*: [online],[cit.2019-03-5] Dostupné z: <https://beliana.sav.sk/media/708>
16. MAJER J.: *Analytická chémie, Učebnica pre farmaceutické fakulty*, Osveta Bratislava 1990.
17. OZKAN S.A.: *Electroanalytical Methods in Pharmaceutical Analysis and their Validation*, HNB Publishing, , New York 2012 ISBN 978-0-9664286-7-4.

18. MARTINEZ-ORTIZ F.: *New Developments in cyclic voltametry at the dropping mercury electrode*. *Electrochimica Acta*, 45, 387-397, 1999.
19. *Elektróda DME*: [online], [cit. 2019-03-5], Dostupné z: <http://ach.upol.cz/cs/>.
20. BAREK J.: *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii*, 3-14, Praha: Karolinum 2006 80-7194-496-3.
21. ŠVANCARA T.: *Carbon paste electrodes in modern electroanalysis*. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31, 311-345, 2001.
22. ADAMS R. N.: *Carbon paste electrodes*, *Analytical Chemistry*, 30 (1576), 1958.
23. KALCHER K.: *Electrochemical sensors and biosensors based on heterogeneous carbon materials*, 2019.
24. ŠEBKOVÁ S.: *Stanovení chloridu na stříbrných kompozitních elektrodách*, *Chemické listy*, 97, 201-250, 2003.
25. LIBANSKÝ M.: *Voltametrické stanovení triclosanu pomocí systému měrných cel s integrovanou uhlíkovou elektrodou*. *Chemické listy* 107, 247-252, 2013.
26. MENDEZ J H.: *Polarographic determination of glycine with a dropping copper amalgam electrode*. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 66, 53-65, 1975.
27. NOVOTNY L., YOSYPCHUK B.: *Pevné stříbrné amalgámové elektrody*, *Chemické listy* 94,1118-1120, 2000.
28. MIKKELSEN Ø., Schroder K. H.: *Dental amalgam in voltammetry - some preliminary results*, *Analytical Letters*, 33, 3253-3269, 2000.
29. YOSYPCHUK B., BAREK J.: *Analytical applications of solid and paste amalgam electrodes*, *Critical Review, Analytical Chemistry*. 39, 189-203, 2009.
30. PAULIUKAITĖ R.: *Characterization and applications of a bismuth bulk electrode*, *Electroanalysis* 9,719-723, 2004.
31. ECONOMOU A.: *Bismuth-film electrodes: recent developments an potentialities for electroanalysis*. *Trends in Analytical Chemistry*, 24, 334-34, 2005.
32. KLOUDA P.: *Moderní analytické metody*, upravené vydanie ISBN 80-863-6907-2, Ostrava 2003.
33. *Krivka I-E zmeraná v základnom elektrolyte*: BAREK J.: *Elektroanalytická chemie*, Praha: Karolinum 2005, ISBN 80-246-1146-5
34. HEYROVSKÝ J., ZUMAN P.: *Úvod do praktické polarografie*, Nakladatelství Československé akademie věd, s 224, 1964 Praha

35. *Katodické a anodické krivky*: BAREK J., *Elektroanalytická chemie*, Praha: Karolinum 2005 ISBN 80-246-1146-5.
36. *Potenciálový program a prúdová odozva*, BAREK J., *Elektroanalytická chemie*, Praha: Karolinum 2005 ISBN 80-246-1146-5
37. *Priebeh potenciálu – voltamperometrická krivka*, OPEKAR F.: *Základní analytická chemie*. Praha: Karolinum, s. 208, 2002, ISBN 80-246-0553-8.
38. PLESKOV Y.V., RUSS J.: *Electrochemistry of diamond*, Russian Journal of Electrochemistry, 38(12) 1275-1291, 2002.
39. XU J.S., CHEN Q. Y., SWAIN G.M.: *Analytical chemistry*, 70, 3146-3154, 1998.
40. CHAILAPAKUL O.,SIANGPROH W.: *Sens.Lett.* 4-99, 2006.
41. PLESKOV Y.V.,SAKHAROVA A.Y., KROTOVA M.D., BOUILOV L.L.: *Electroanalytical Chemistry* 228-19, 1987.
42. CVACKA J.,QUAISEROVA V., PARK J., SHOW Y., SWAIN.G,M.: *Boron-doped diamond microelectrodes for use in capillary electrophoresis with electrochemical detection*. *Analytical Chemistry* 75(11), 2678-2687, 2003.
43. TANG L., TSAI C., GERBERICH W. W., KRUCKERBERG L.: *Biocompatibility of chemical-vapor-deposited diamond*. *Biomaterials* 16(6) 483-8, 1995.
44. CVAČKA J., SWAIN G., BAREK J., ZIMA J.: *Chemické listy* 96, 33 2002.
45. MCCREEY R.L., *Electrochemical Properties of Carbon Surfaces*, *Interfacial Elektrochemie* (Wieckowski A.,ed.) kap. 35, 631-647, Dekker:New York 1999.
46. DUO I. a kol.: *Electron Transfer Kinetics on Boron-Doped Diamond Film Electrodes- New Tool for Voltammetric Determination of Organic Substance*. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 39,148-172, 2009.
47. ZAVAZALOVA J. a kol.: *Boron Doped Diamond Electrodes in Voltammetry: New Design and Applications. An Overview*. *Sensing in Electroanalysis*, Pardubice, 8, 21-34 2013/2014.
48. ALFAROL QUIROZ M.A., FEROLL S., MARTÍNEZ-HUITLE C.A., VONG NEAS Y.: *Boron doped diamond electrode for the wastewater treatment*, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, On-line version ISSN 1678-4790 2006.
49. MUSILOVÁ J., BAREK J., PECKOVÁ K.: *Použití diamantových filmových elektród dopovaných borem pro stanovení organických látek*, *Chemické Listy* 103, 469 478 2009.

50. SCHMALZ V., DITTMAR T., HAAKEN D., WORCH E.: *Electrochemical disinfection of biologically treated wastewater from small treatment systems by using boron-doped diamond (BDD) electrodes* – Contribution for direct reuse of domestic wastewater Water Research 20, December 2009.
51. PECKOVÁ K K., MUSILOVÁ J., BAREK J.: *Boron-doped diamond film electrodes – New tool for voltammetric determination of organic substances*. Critical Review Analytical Chemistry 39, 148-172, 2009.
52. PECKOVÁ K K., MUSILOVÁ J., BAREK J.: *The Use of Boron-Doped Diamond Film Electrodes for Detection of Organic Compounds* , Chemické listy 103 (6) , 469-478, 2009.
53. COBB V., SAMUEL J., AYRES Z., MACPHERSON J.: *Boron Doped Diamond: A Designer Electrode Material for the Twenty-First Century*, Annual review of analytical chemistry, 463-48, 2018.
54. RIBERIO P., WIRLEY F.,MORAIS C. P., De LIMA-NETO S., NUNES A., *Sensing of formetanate pesticide in fruits with a boron-doped diamond electrode*, Microchemical journal, 24-29, 2018.
55. ŠTĚPÁNKOVÁ M., ŠELEŠOVSKÁ R., JANÍKOVÁ L., CHÝLKOVÁ J.: *Voltammetric determination of mesalazine in pharmaceutical preparations and biological samples using boron-doped diamond electrode*, Chemické listy 112 (6) 389-395, 2018.
56. BRYCHT M., KACZMARSKA K., USLU B., SIBEL A. OZKAN, SKRZYPEK S.: *Sensitive determination of anticancer drug imatinib in spiked human urine samples by differential pulse voltammetry on anodically pretreated boron-doped diamond electrode*, Diamond and Related Materials 13-22, 2016
57. CARLOS S., OLIVEIRA B., OLIVEIRA-BRETT A.M.: *In Situ DNA Oxidative Damage by Electrochemically Generated Hydroxyl Free Radicals on a Boron-Doped Diamond Electrode* , Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, 3004-535, Coimbra, Portugal, 2012.
58. SOCHR J., MACHKOVÁ M., MACHYŇÁK Ľ., ČACHO F., ŠVORC Ľ.: *Heavy metals determination using various in situ bismuth film modified carbon-based electrodes*, Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Acta Chimica Slovaca 9(1) , 28-35, 2016

59. KATHRYN E., TOGHIL L., COMPTON R.: *Metal Nanoparticle Modified Boron Doped Diamond Electrodes for Use in Electroanalysis*, *Elektroanalysis* 22 (17-18) 1947-1956, 2010.
60. SVITKOVA J.; IGNAT T., ŠVORC L.: *Chemical Modification of Boron-Doped Diamond Electrodes for Applications to Biosensors and Biosensing*, *Critical reviews in analytical chemistry* 46 (3) 248-256, 2016.
61. MASTÍK J.: *Nesteroidné antireumatiká v liečbe akútnej bolesti hlavy*, I. neurologická klinika Nemocnice u sv. Anny, SOLEN Brno 2004.
62. ALTINOZ S., NEMUTLU E., KIR S.: *Polarographic behaviour of meloxicam and its determination in tablet preparations and spiked plasma*, 463-468, 2002.
63. *Chemická štruktúra MLX*, [online], [cit. 2019-04-03] Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-meloxicam-MX_fig1_23266292
64. *Príbalová informace: Informace pro pacienta*, [online], [cit.2019-04-02], SÚKL Sp. Zn. sukl5 65976/2015, Dostupné z: <http://www.sukl.cz/download/pil/PI10777.pdf>
65. *Identification of lornoxicam*, [online], [cit. 2019-04], Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06725>
66. MADNI A., AHMAD M., USMAN M.: *New High Performance Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Diclofenac and Meloxicam in Oral Formulation of Liposomes and Human Plasma*, *Journal of the chemical society of Pakistan* 32, 654-661, 2010.
67. LEAL L., BEDOR D., MELO E.: *Determination of Meloxicam in Human Plasma Administrated with Four Drugs by LC Method: Application to a Pilot Bioavailability Study*, *Latin America journal of pharmacy* 30, 1883-1888, 2011.
68. LEE HW., JI HY, KIM HY.: *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of meloxicam and its metabolite 5-carboxymeloxicam in human plasma*, *Bioanalysis* 1, 63-70, 2009.
69. MANDRESCU M., SPAC AF., DOMEANU V.: *Spectrophotometric Determination of meloxicam*, *Revista de chimie* 60, 160-163, 2009.
70. GURUPADAYA B., TRINATH M., SHILPA K.: *Spectrophotometric determination of meloxicam by sodium nitroprusside and 1,10-phenanthroline reagents in bulk and its pharmaceutical formulation*, *Indian Journal of Chemical technology* 111-115, 2013.

71. SHAH R.K.: *Spectrophotometric Micro determination of Silver(I) using Meloxicam as a New Analytical Reagent*, Oriental Journal of Chemistry 32, 499-507, 2016.
72. TIAN J., LI CH., SHAOPU L.: *A rapid and highly sensitive fluorimetric method for the determination of meloxicam using uranyl acetate*, Analytical Methods 6, 5221-5226, 2014.
73. RADI AE., GHONEIM M. BELTAGI A.: *Cathodic adsorptive stripping square-wave voltammetry of the anti-inflammatory drug meloxicam*, Chemical & Pharmaceutical Bulletin 49, 1257-1260, 2001a.
74. BELTAGI AM, GHONEIM MM, RADI A.: *Electrochemical reduction of meloxicam at mercury electrode and its determination in tablets*, Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 27, 795-801, 2002.
75. ALTINOZ S., NEMUTLU E., KIR S.: *Polarographic behaviour of meloxicam and its determination in tablet preparations and spiked plasma*, FARMACO 57, 463-468, 2002.
76. BELTAGI AM, GHONEIM MM, RADI A.: *Electrochemical reduction of meloxicam at mercury electrode and its determination in tablets*, Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 27, 795-801, 2002.
77. BELTAGI AM, GHONEIM MM, RADI A.: *Electrochemical reduction of meloxicam at mercury electrode and its determination in tablets*, Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 27, 795-801, 2002.
78. RADI AE., EL R., ANWAR M.: *Electrochemical oxidation of meloxicam and its determination in tablet dosage*, Analytical letters 34, 739-748, 2001b.
79. WANG CH., SHAO X., QU Q.: *Differential pulse voltammetric determination of nimesulide in pharmaceutical formulation and human serum at glassy carbon electrode modified by cysteic acid/CNTs based on electrochemical oxidation of l-cysteine*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 42(2), 44-237, 2006
80. CHEEMALAPATI, SRIKANTH, DEVADAS B., CHEN SM.: *Novel poly-L-lysine/carboxyl-group enriched graphene oxide/modified electrode preparation, characterization and applications for the electrochemical determination of meloxicam in pharmaceutical tablets and blood serum*, Analytical methods 6, 8426-8434, 2014.
81. AZODI -D., SAMAN A., ABDOUSS M.: *Determination of meloxicam in plasma samples using a highly selective and sensitive voltammetric sensor based on carbon paste electrodes modified by molecularly imprinted polymer nanoparticle-multiwall carbon nanotubes*, Analytical methods 7, 1280-1292, 2015.

82. RADI AE., EL R., ANWAR E.: *Electrochemical oxidation of meloxicam and its determination in tablet dosage*, Analytical letters 34, 739-748, 2001b.
83. *COMPOUND SUMMARY Lornoxicam*, U.S. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology,[online],[2019-04-20], Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54690031>.
84. *Príbalový leták Lornoxicam*,[online],[2019-04-20], Dostupné z: <https://www.adc.sk/databazy/produkty/spc/xefo-8-mg-filmom-obalene-tablety-988766.html>.
85. *Chemická štruktúra LRX*, [online], [2019-04-21], Dostupné z: <https://www.biorbyt.com/lornoxicam-orb134872.html>.
86. KUMAR D., TANUJA S., RAO S.: *A Validated RP-HPLC Method for the Determination of Lornoxicam* , Indian journal of pharmaceutical education and research 45(2), 153-156, 2011.
87. YOUNG HOON K., YOUNG HYE J., EUN-SEOK J.: *Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric determination of lornoxicam in human plasma*, Archives of pharmacal research 30(7) , 905-910, 2007.
88. SUWA T.,URANO H., SHINOHARA Y.: *Simultaneous high-performance liquid-chromatographic determination of lornoxicam and it's 5'-hydroxy metabolite in human plasma using electrochemical detection*, Journal of chromatography – biomedical applications 617(1),10-105, 2006.
89. DEMICRAN N.E., KIR S.: *Determination of lornoxicam in pharmaceutical preparations by zero and first order derivative UV spectrophotometric methods*, PHARMAZIE 60 (6), 421-42, 2005.
90. GHONEIM MM., BELTAGI AM.,RADI A.: *Square-wave adsorptive stripping voltammetric determination of the anti-inflammatory drug lornoxicam*, Analytical sciences, 18 (2), 183-186, 2002.
91. BOZAL B., USLU B.: *Applications of carbon based electrodes for voltammetric determination of lornoxicam in pharmaceutical dosage form and human serum*, 2010.
92. JEHLIČKA V.: *Programové zabezpečení výpočtu meze detekce a meze stanovitelnosti při využití lineární regrese v analytické chemii*. Media4u Magazine: Čtvrtletní časopis pro podporu vzdělávání [online] [cit. 2016-02-25] Praha, 41-45, 2015