

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2021

Bc. Anna Vokounová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vývoj voltametrických metod stanovení vybraných biologicky aktivních látek
s využitím různých pracovních elektrod

Diplomová práce

AUTOR PRÁCE: Bc. Anna Vokounová

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

KONZULTANT: MSc. Oleksandr Matvieiev

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Anna Vokounová**
Osobní číslo: **C19595**
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Voltametrické stanovení protizánětlivého léčiva tenoxicamu**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

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 tenoxicamu. Zaměřte se na problematiku jejich voltametrického chování, resp. možností stanovení s využitím různých pracovních elektrod.

Experimentální část:

V rámci experimentální části prostudujte voltametrické chování tenoxicamu na borem dopované diamantové elektrodě.

Navrhnete podmínky stanovení léčiva v modelových roztocích. Vyvinutou metodu aplikujte při analýze praktických vzorků.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Renáta Šelešovská, Ph.D.**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství
Konzultant diplomové práce: **MSc. Oleksandr Matvieiev**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

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

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Voltametrické stanovení protizánětlivého léčiva tenoxikamu, jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 4. 5. 2021

.....
Bc. Anna Vokounová

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé diplomové práce doc. Ing. Renátě Šelešovské, Ph.D., za pomoc, ochotu, odborné vedení a rady během vypracování této práce. Také bych chtěla poděkovat svému konzultantovi MSc. Oleksandrovi Matvieievovi za pomoc s experimentální částí práce.

Tato diplomová práce byla vypracována s finanční podporou Grantové agentury České republiky, projekt č. 20-01589S.

ANOTACE

Cílem této diplomové práce bylo studium voltametrického chování protizánětlivého léčiva tenoxicamu na borem dopované diamantové elektrodě a vývoj metody jeho stanovení. Byly optimalizovány parametry diferenčně pulzní i square wave voltametrie a na základě získaných statistických údajů byla vybrána vhodnější metoda. Ta byla úspěšně aplikována při analýze modelových roztoků tenoxicamu a rovněž při stanovení dalších oxikamových léčiv jak v modelových roztocích, tak ve farmaceutických přípravcích. Na závěr byla nová metoda přenesena také na tištěné senzory na bázi bodem dopovaného diamantu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Voltametrie, borem dopovaná diamantová elektroda, tištěné elektrody, tenoxicam, oxikamová léčiva, farmaceutické přípravky

ANNOTATION

The aim of this thesis was to study the voltammetric behavior of the anti-inflammatory drug tenoxicam on a boron doped diamond electrode and to develop a method for its determination. The parameters of differential pulse and square wave voltammetry were optimized and the more suitable method was chosen on the basis of the obtained statistical data. This was subsequently successfully applied in the analysis of model solutions of tenoxicam and also in the determination of other oxicam drugs in both model solutions and pharmaceutical preparations. Finally, the new method was transferred to screen-printed sensors based on boron doped diamond.

KEYWORDS

Voltammetry, boron doped diamond electrode, screen-printed electrode, tenoxicam, oxicam based drugs, pharmaceutical preparation

OBSAH

ÚVOD	12
1. Teoretická část	13
1.1 Voltametrie	13
1.1.1 Princip voltametrie	14
1.1.2 Voltametrické metody	18
1.1.3 Pracovní elektrody	22
1.1.4 Borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE)	25
1.2 Tenoxikam	29
1.2.1 Fyzikálně chemické vlastnosti tenoxikamu	29
1.2.2 Mechanismus účinku	30
1.2.3 Stanovení tenoxikamu s využitím různých instrumentálních metod	31
1.2.4 Voltametrické stanovení tenoxikamu	31
2. Experimentální část	33
2.1 Použité chemikálie	33
2.2 Přístrojové vybavení	33
2.3 Pracovní postupy	35
2.3.1 Příprava BDDE	35
2.3.2 Voltametrická měření	35
2.3.3 Analýza farmaceutických přípravků	36
3. Výsledky a diskuse	37
3.1 Voltametrické chování tenoxikamu na BDDE	37
3.1.1 Závislost voltametrického chování tenoxikamu na pH	38
3.1.2 Závislost voltametrického chování tenoxikamu na rychlosti polarizace	39
3.2 Vývoj metody voltametrického stanovení TNX na BDDE	40
3.2.1 Volba vhodného základního elektrolytu	40
3.2.2 Optimalizace parametrů DPV	42
3.2.3 Optimalizace parametrů SWV	44
3.2.4 Předúprava BDDE	46
3.2.5 Analýza modelových roztoků tenoxikamu s využitím BDDE	47
3.2.6 Analýza modelových roztoků dalších léčiv ze skupiny oxikamů	51
3.3 Analýza farmaceutických přípravků s využitím SWV ve spojení s BDDE	56
3.4 Předběžné testování tištěných senzorů na bázi BDDE	58
3.4.1 Porovnání voltametrického chování TNX na testovaných elektrodách	59
3.4.2 Analýza modelových roztoků tenoxikamu	60

3.4.3 Analýza farmaceutického přípravku	65
ZÁVĚR	68
POUŽITÁ LITERATURA	70

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	Amplituda [V]
AdSV	Adsorpční rozpouštěcí voltametrie (Adsorptive stripping voltammetry)
AgSAE	Stříbrná pevná amalgámová elektroda (Silver solid amalgam electrode)
ASV	Anodická rozpouštěcí voltametrie (Anodic stripping voltammetry)
β -CD	β -cyklodextrin
BDDE	Borem dopovaná diamantová elektroda
c	Koncentrace elektroaktivních látek [mol/l]
COX	Cyklooxygenáza
CPE	Uhlíková pastová elektroda (Carbon paste electrode)
CSV	Katodická rozpouštěcí voltametrie (Cathodic stripping voltammetry)
CV	Cyklická voltametrie
CVD	Chemická depozice par (Chemical vapor deposition)
D	Difúzní koeficient látky [cm^2/s]
DCV	Stacionární voltametrie (Direct current voltammetry)
DME	Kapající rtuťová elektroda (Dropping mercury electrode)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
$E_{1/2}$	Půlvlnový potenciál [V]
$\Delta E_{1/2}$	Rozdíl půlvlnových potenciálů [V]
$E_{p,a}$	Potenciál anodického píku [V]
$E_{p,k}$	Potenciál katodického píku [V]
E_{kon}	Konečný potenciál [V]
E_{obratu}	Potenciál obratu [V]
E_p	Potenciál píku [V]
$E_{poč}$	Počáteční potenciál [V]
f	Frekvence pulzu [Hz]
GCE	Elektroda ze skelného uhlíku (Glassy carbon electrode)
HDME	Visící rtuťová kapková elektroda (Hanging mercury drop electrode)
HPHT	Vysoký tlak, vysoká teplota
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography)

I_d	Difúzní proud [A]
$I_{d \text{ lim}}$	Limitní difúzní proud [A]
I_p	Výška píku [A]
$I_{p,a}$	Proud anodického píku [A]
$I_{p,k}$	Proud katodického píku [A]
ΔI	Rozdíl proudu [nA]
j	Proudová hustota [nA/mm ²]
k	Konstanta
LDR	Lineární dynamický rozsah [mol/l]
LOD	Limit detekce [mol/l]
LOQ	Mez stanovitelnosti [mol/l]
LRX	Lornoxikam
m	Průtok rtuti kapilárou [mg/s]
MFE	Rtuťová filmová elektroda (Mercury film electrode)
MLX	Meloxikam
MWCNT	Uhlíkové nanotrubičky s několika stěnami (Multiwalled carbon nanotubes)
n	Počet vyměněných elektronů
NSAID	Nesteroidní protizánětlivé léčivo (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs)
PRX	Piroxikam
RNA	Ribonukleová kyselina
SAM	Metoda standardního přidavku (Standard addition method)
SMDE	Statická rtuťová kapková elektroda (Static mercury drop electrode)
SPE	Tištěné elektrody (Screen-printed electrodes)
SV	Rozpouštěcí voltametrie (Stripping voltammetry)
SWV	Voltametrie čtvercových vln (Square-wave voltammetry)
t	doba kapky [s]
TNX	Tenoxikam
UV	Ultrafialové (Ultraviolet)
V	Objem [L]
v	Rychlost polarizace [V/s]

ÚVOD

Nesteroidní protizánětlivé léčivo (NSAID) tenoxikam patří do skupiny oxikamů. Má silné protizánětlivé účinky a vyznačuje se dlouhým poločasem setrvání v krevní plazmě. Je podáván pacientům s revmatoidní artritidou. U většiny pacientů je dobře snášen, ale u některých se může projevovat nevolnost, poruchy trávení nebo zvýšené riziko selhání ledvin. Proto je důležité monitorovat množství léku v krvi ale i ostatních tělních tekutinách. Důležité je rovněž mít k dispozici jednoduché a rychlé metody pro kontrolu kvality léčiv a stanovení obsahu účinných látek ve farmaceutických přípravcích. Vzhledem k tomu, že dochází také k pronikání léčiv do životního prostředí v důsledku jejich nadužívání, špatné malinupace s nimi a neodborné likvidace, je třeba monitorovat hladiny těchto látek i ve složkách životního prostředí, zejména ve vodě.

Při stanovení léčiv se využívají různé instrumentální analytické metody. Nejčastěji jde o vysokoúčinnou kapalinovou chromatografie např. s UV nebo hmotnostní detekcí. Jedná se o velice citlivou metodu, která je ale instrumentálně, a tedy i finančně náročná a obvykle vyžaduje složitou přípravu vzorku k analýze. Rychlejší, levnější a jednodušší alternativou mohou být elektroanalytické metody, konkrétně voltametrie. Dalšími výhodami voltametrické analýzy může být možnost miniaturizace a využití přenosných analyzátorů nebo vývoj biosenzorů i s možností analýzy *in vivo*. Dříve byly ve voltametrii (polarografii) používány zejména rtuťové elektrody, které sice mají výjimečné elektrochemické vlastnosti, vzhledem k toxicitě rtuti byly postupně nahrazovány jinými pracovními elektrodami z ušlechtilých kovů nebo různých forem uhlíku. V dnešní době se neustále vyvíjejí nové elektrodové materiály a jejich modifikace, které by měly vést ke zvýšení citlivosti a zejména selektivity měření. Jedním z perspektivních elektrodových materiálů současnosti je borem dopovaný diamant, který je díky svým vlastnostem využitelný pro analýzy redukovatelných i oxidovatelných látek v širokém rozsahu potenciálů a současně je vhodným substrátem pro různé povrchové modifikace.

Cílem této diplomové práce je studium voltametrického chování tenoxikamu na borem dopované diamantové elektrodě a vývoj voltametrické metody jeho stanovení.

1. Teoretická část

1.1 Voltametrie

Voltametrie patří mezi elektroanalytické metody a je založena na měření křivek závislosti proudu na potenciálu pracovní elektrody během elektrolýzy analyzovaného roztoku (Opekar, 2002). Tato metoda se postupně vyvinula z polarografie. Tu počátkem 20. let 20. století objevil český chemik Jaroslav Heyrovský (Barón-Jaimez, 2013), když při práci s kapající rtuťovou elektrodou zjistil, že dochází k redukci iontů v blízkosti elektrody a k následné změně intenzity proudu procházejícího elektrochemickým článkem (Heyrovský, 1922). Ruční záznamy polarografických křivek byly zdlouhavé, a proto Heyrovský spolu se svým žákem M. Shikatou v roce 1924 sestrojil přístroj, který jako první automaticky zaznamenával křivky závislosti proudu na napětí. Přístroj nazvali polarograf (Butler, 1967).

Za objev polarografie byla 26. 9. 1959 udělena Jaroslavu Heyrovskému Nobelova cena za chemii (Zuman, 1989). Na obrázku 1 je Jaroslav Heyrovský zachycen při jejím přebírání.



Obrázek 1 Slavnostní předávání Nobelovy ceny Jaroslavu Heyrovskému 10. prosince 1959 ve Stockholmu (Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského)

1.1.1 Princip voltametrie

Zatímco polarografie využívá během měření jednoduché elektrochemické články, které jsou složeny z polarizovatelné pracovní elektrody a referentní elektrody, voltametrie využívá ještě pomocné elektrody. Hovoří se o tříelektrodovém uspořádání článku. Na povrchu pracovní elektrody dochází k oxidacím nebo redukcím stanovovaných látek při určitém potenciálu. Referentní elektroda slouží jako srovnávací, mající konstantní potenciál (Kounaves, 1997). U polarografie slouží jako pracovní kapající rtuťová elektroda (DME). U voltametrie se používají stacionární elektrody, např. visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) nebo tuhé elektrody na bázi kovových nebo uhlíkových materiálů.

Na elektrody ponořené do analyzovaného roztoku je vkládáno s časem se měnící napětí. Sleduje se závislost protékajícího elektrického proudu na potenciálu pracovní elektrody (Gulabovski, 2008). Pokud se v roztoku nacházejí látky, které se při určitém potenciálu redukují nebo oxidují, dochází k depolarizaci pracovní elektrody a protéká jí proud. Intenzita elektrického proudu je přímo úměrná koncentraci analytu. Jestliže se v elektrolytu nenacházejí elektroaktivní látky, jež mohou podléhat redukcii nebo oxidaci na pracovní elektrodě v rozsahu využitelných potenciálů, nedochází k průchodu proudu a elektroda je zpolarizována (Opekar, 2002).

1.1.1.1 Elektrochemický článek

Elektrochemický článek ve voltametrii se skládá z pracovní, referentní a pomocné elektrody, které jsou ponořené do roztoku základního (indiferentního) elektrolytu. Základní elektrolyt má řadu funkcí, konkrétně potlačuje nežádoucí migraci iontů analytu, zvyšuje v roztoku elektrickou vodivost (přenesení náboje pomocí iontů elektrolytu) nebo reguluje pH během měření. Elektrolytem může být silná kyselina, silná zásada, neutrální sůl (KCl nebo KNO_3) nebo vhodný pufr. Je důležité, aby koncentrace elektrolytu byla alespoň 20× vyšší než koncentrace analytu (Zuman, 2006). V některých případech může být referentní elektroda umístěna v odděleném prostoru a připojena pomocí solného můstku. Zatímco proud protéká mezi pracovní a pomocnou elektrodou, potenciál pracovní elektrody se měří mezi pracovní a referentní elektrodou za bezproudového stavu (Opekar, 2002)

Na polarizovatelné pracovní elektrodě v průběhu měření probíhá chemická reakce, která může změnit její vlastnosti. Tato změna má následně vliv na opakovatelnost měření. Je možné buď elektrodu vyměnit, její povrch regenerovat (mechanicky nebo elektrochemicky), nebo

využívat elektrody s obnovitelným povrchem. Obvykle se používají pracovní elektrody, jejichž povrch je maximálně 20 mm², nebo mikroelektrody s povrchem nejvýše 0,05 mm². Pracovní elektrody jsou většinou pojmenovány podle materiálu, ze kterého jsou vyrobeny (Girault 1997). Běžnými materiály jsou různé formy grafitu a kovů. Nejčastějším kovovým materiálem pro výrobu elektrod je rtuť, zlato nebo platina. Ve voltametrii se používají nejčastěji následující pracovní elektrody: visící rtuťová kapková elektroda (HMDE), uhlíkové elektrody (např. elektroda ze skleného uhlíku (GCE) nebo uhlíková pastová elektroda (CPE)), stříbrná pevná amalgámová elektroda (AgSAE), nebo elektroda z borem dopovaného diamantu (BDDE) (Henze, 2000).

Jako nepolarizovatelné referenční elektrody se používají elektrody druhého druhu, sestavené z kovu, z jeho těžko rozpustné soli a elektrolytu obsahujícího příbuzný aniont (Guth, 2009). Referenčními elektrodami bývají nejčastěji nasycená kalomelová (Hg/Hg₂Cl₂/KCl) nebo argentchloridová (Ag/AgCl/KCl) elektroda (Opekar, 2002). Tyto referenční elektrody jsou snadno sestavitelné a udržují konstantní potenciál při nízkém průchodu proudu (Henze, 2000).

Pomocnou elektrodou ve voltametrii bývá obvykle platinová elektroda. Jedná se o inertní materiál (z důvodu rozpouštění v elektrolytu). Dalším materiálem může být uhlík, měď nebo nerezová ocel. Pomocná elektroda se používá k vytvoření spojení s elektrolytem za účelem přivedení proudu na pracovní elektrodu a zároveň chrání referenční elektrodu před polarizací elektrickým proudem (Chemistry Libretext, 2019).

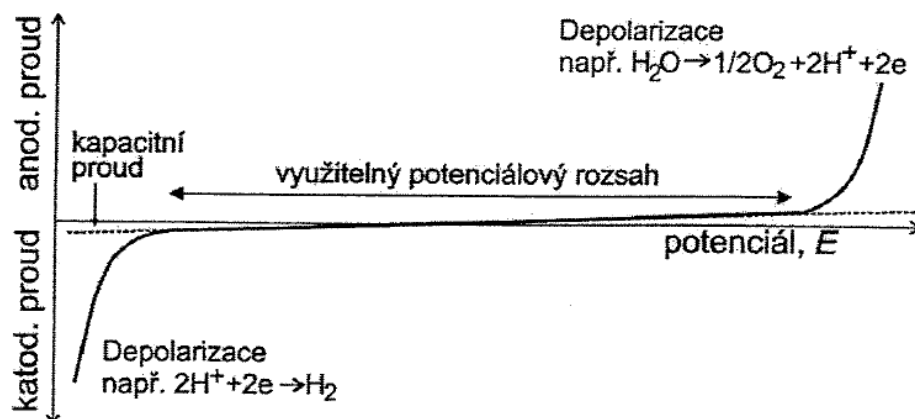
1.1.1.2 Polarizace, depolarizace elektrod a polarizační křivka

Na rozhraní mezi elektrodou a elektrolytem se za bezproudého stavu ustaví rovnováha charakterizována rovnovážným napětím poločlánku. Protéká-li elektrochemickým článkem proud, dochází k narušení dynamické rovnováhy, a tedy ke změně elektrického napětí mezi elektrodou a elektrolytem. Tato změna se označuje jako polarizace elektrod. Polarizace se dělí do tří skupin: koncentrační, elektrochemická a chemická. Velikost polarizace závisí na mnoha faktorech, např: na velikosti povrchu elektrody, koncentraci elektrolytu nebo na proudové hustotě (Kolářová, 2007). Elektrody, které snadno mění svůj potenciál vlivem procházejícího proudu, se nazývají polarizovatelné a využívají se jako pracovní (indikační) elektrody. Naopak elektrody, které svůj potenciál vlivem průchodu proudu nemění, se označují jako

nepolarizovatelné. Obvykle jsou to elektrody s velkým pracovním povrchem a využívají se jako referentní.

Pokud se polarizovatelná a nepolarizovatelná elektroda zapojí do elektrochemického článku a vloží se na něj napětí, dojde k takovým změnám potenciálu polarizovatelné elektrody, které povedou k vytvoření polarizačního napětí odpovídajícího vloženému napětí. Vzhledem k tomu, že polarizační napětí je dáno rozdílem potenciálů polarizovatelné a nepolarizovatelné elektrody, reakcí na změnu vloženého napětí bude pouze změna potenciálu polarizovatelné elektrody. Potenciál nepolarizovatelné elektrody je konstantní (Kříženecká, 2007). V přítomnosti látky podléhající redoxním reakcím dojde při zvyšování napětí v určitém okamžiku k překročení hodnoty rozkladného napětí a na polarizovatelné elektrodě dochází k elektrolýze analytu. Tento proces se označuje jako depolarizace elektrody a analyt jako depolarizátor (Opekar, 2002). Při negativním potenciálu pracovní elektrody dochází k uvolňování elektronů do roztoku, kde redukují elektroaktivní látky. Elektrodu následně označujeme jako katodu s procházejícím redukčním proudem. Naopak při pozitivním potenciálu pracovní elektrody dochází k odčerpání elektronů z roztoku a k oxidaci elektroaktivních látek. Elektroda s procházejícím oxidačním proudem se nazývá anoda (Kříženecká, 2007).

Polarizační křivka je grafický záznam závislosti proudu na elektrodovém potenciálu. Na obrázku 2 je zaznamenána polarizační křivka v roztoku základního elektrolytu, obsahujícím látky oxidující se a redukující se až při dostatečně vysokých hodnotách potenciálu pracovní elektrody. V určité oblasti potenciálů je elektroda zpolarizována a teče jí pouze kapacitní proud. Tato oblast potenciálů, kdy je pracovní elektroda zpolarizována, může být využita pro vlastní analýzu a označuje se jako využitelný potenciálový rozsah elektrody nebo potenciálové okno. Využitelný potenciálový rozsah elektrody závisí především na materiálu pracovní elektrody, na použitém rozpouštědle a základním elektrolytu. V nevodných roztocích bývá využitelný potenciálový rozsah mnohem širší než u vodných roztoků. U vodných roztoků bývá potenciálový rozsah omezen redukcí vodíkového iontu na straně katodické (přepětí vodíku) a v oblasti anodické oxidací vody (Barek, 2005).



Obrázek 2 Polarizační křivka registrovaná v základním elektrolytu (Barek, 2005)

Polarizační křivka může být rozdělena na tři oblasti. První oblastí je polarizace, kdy proud má nulovou hodnotu. Druhou oblastí je depolarizace, kde dochází k redukci, resp. oxidaci látek a proud vzrůstá. Třetí oblastí je oblast limitního difúzního proudu ($I_{d \text{ lim}}$). Velikost difúzního proudu ($I_{d \text{ lim}}$) je pak přímo úměrná koncentraci analytu v analyzovaném roztoku. Tvarem polarizační křivky je vlna. Její poloha je dána hodnotou půlvlnového potenciálu ($E_{1/2}$). Půlvlnový potenciál odpovídá poloviční hodnotě $I_{d \text{ lim}}$, a je pro určitou látku charakteristický. Jedná se o kvalitativní údaj (Kříženecká, 2007, Křížek a Šíma, 2015).

Pro polarografii, resp. pro DME platí, že velikost I_d se mění podle růstu kapky rtuti. Na začátku kapky dosahuje difúzní proud nejmenší hodnoty a na konci má maximální hodnotu. Je popsán Ilkovičovou rovnicí (1):

$$I_d = k \cdot n \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6} \cdot c \cdot D^{1/2} \quad (1)$$

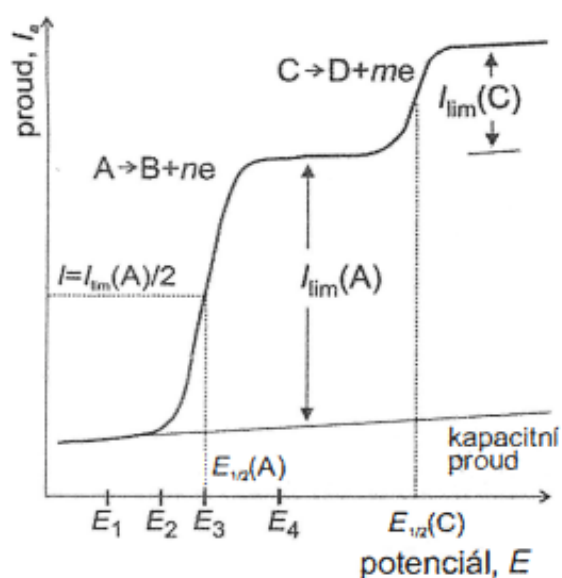
kdy I_d – difúzní proud, k – konstanta, n – počet vyměněných (transportovaných) elektronů, m – průtok rtuti kapilárou (mg/s), t – doba kapky (s), c – koncentrace elektroaktivních látek (mol/l), D – difúzní koeficient látky (cm^2/s) (Ozkan, 2012).

Vedle difúzního proudu rozlišujeme i další dílčí proudy. Jedním z nich je kapacitní (nabíjecí) proud. Při polarizaci rtuťové kapkové elektrody vzniká mezi rtuťí a roztokem elektrická dvojvrstva způsobená adsorpcí látek na povrchu elektrody. Při vkládání napětí na elektrodu rychle vzroste a hned klesne proud. Opakovaný pokles proudu je shodný s životností kapky rtuti. Při růstu povrchu kapky rtuti vzniká i nepřetržitý kapacitní proud, jehož velikost je v řádu 10^{-8} až 10^{-7} A, a který ovlivňuje negativně citlivost voltametrických měření (Křížek a Šíma, 2015).

1.1.2 Voltametrické metody

1.1.2.1 Stacionární voltametrie

U stacionární voltametrie (DCV – Direct current voltammetry) se vkládaný potenciál na pracovní elektrodu lineárně mění s časem, roste nebo klesá. Tuto metodu lze považovat za stacionární při konstantním potenciálu, pokud je rychlost změny potenciálu dostatečně malá ve srovnání s rychlostí ustavování rovnováhy u povrchu elektrody (Barek, Opekar, Stuhlík, 2005). Grafickým výstupem měření je voltametrická křivka, která znázorňuje závislost proudu na potenciálu (obrázek 3). Touto metodou lze stanovovat organické i anorganické látky, jejichž půlvalnový potenciál se dostatečně liší ($\Delta E_{1/2}$ je větší než 200 mV). Tato technika není vhodná pro vzorky s nízkou koncentrací stanovované látky. Limity detekce u DC voltametrie se pohybují v rozmezí 10^{-5} až 10^{-6} mol/l (Aguirre Gomez, 2006).



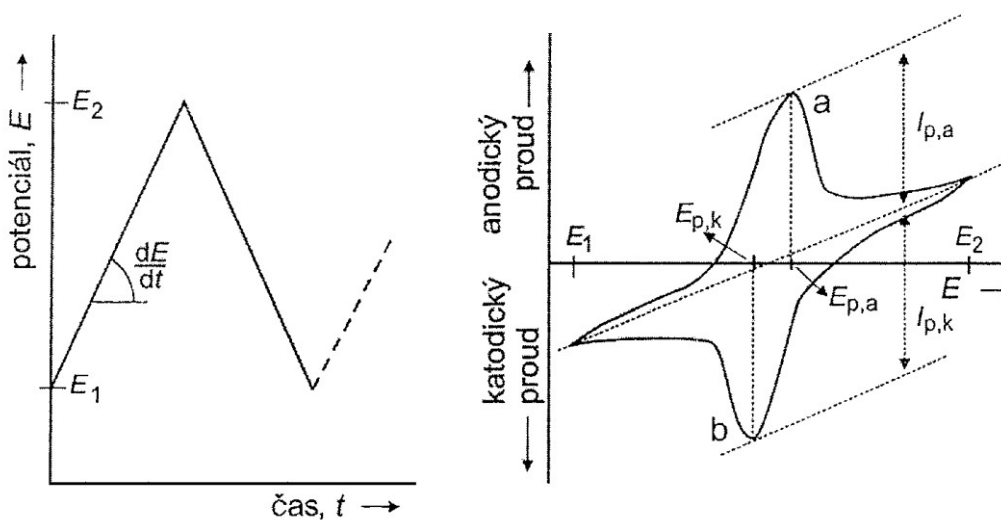
Obrázek 3 DC voltametrická křivka zaznamenávající redukci látek A a C (Barek, 2005)

1.1.2.2 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie (CV – Cyclic voltammetry) patří mezi univerzální elektroanalytické techniky a poskytuje informace o redoxních dějích, jimž podléhají elektrochemicky aktivní látky, a o kinetice probíhajících elektrodových reakcí. Je to metoda používaná zejména pro studium voltametrického chování látek a již méně se využívá pro kvantitativní analýzu. Principem cyklické voltametrie je, že se na pracovní elektrodu vkládá lineárně rostoucí nebo klesající napětí jdoucí nejprve v jednom směru (dopředný sken) a poté v protichůdném směru (zpětný sken) (obrázek 4A). Z naměřeného proudu v závislosti na potenciálu se sestaví tzv.

cyklický voltamogram (obrázek 4B). Protože se potenciál lineárně mění s časem, je možné zobrazit osu x jako osu časovou (Kissinger a Heineman, 1983).

Cyklická voltametrie má důležitý význam při studiu elektrodových reakcí. Z průběhu katodických a anodických křivek lze usuzovat na mechanismus elektrodové reakce nebo posuzovat jejich reverzibilitu. Pro reverzibilní elektrodovou reakci platí, že rozdíl potenciálu anodického a katodického píku $E_{p,a} - E_{p,k} = 0,059/n$ (kdy n je počet vyměněných elektronů) a podíl proudů anodického a katodického píku ($I_{p,a}/I_{p,k}$) je roven jedné. Dále platí, že potenciál píku je nezávislý na rychlosti změny potenciálu (dE/dt) a je o $28,5/n$ mV negativnější u katodického píku nebo pozitivnější u anodického píku, než je hodnota půlvlnového potenciálu. Pro ireverzibilní elektrodovou reakci platí, že rozdíl potenciálů anodického a katodického píku závisí na rychlosti polarizace (Barek, 2005).

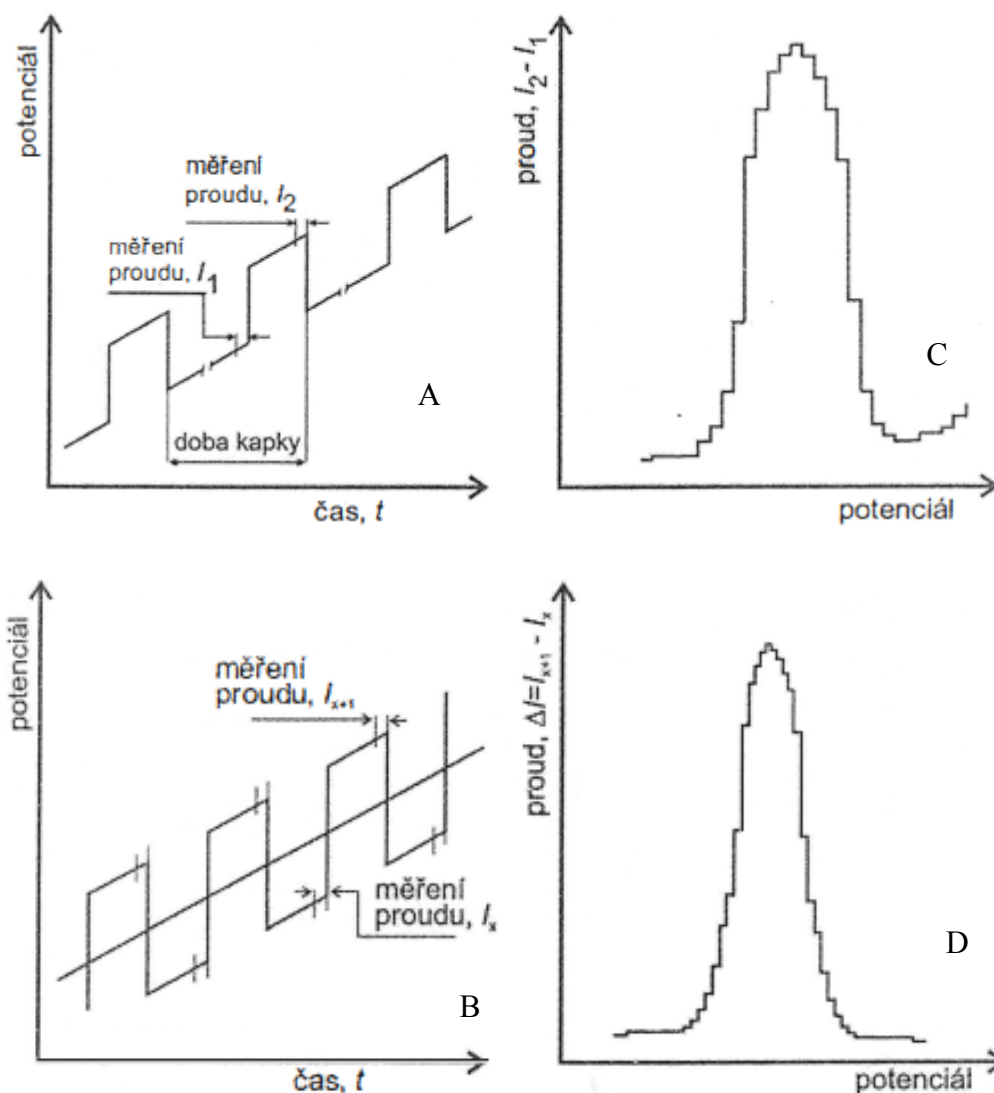


Obrázek 4 Průběh potenciálu vkládaného na pracovní elektrodu při CV v závislosti na čase (A) a cyklický voltamogram (Barek, 2005)

1.1.2.3 Diferenčně pulzní voltametrie

U diferenčně pulzní voltametrie (DPV – Differential pulse voltammetry) se na pracovní elektrodu vkládá lineárně rostoucí napětí překládané napěťovými pulzy (obrázek 5A). Proud je měřen ve dvou krocích, vždy před začátkem pulzu a před jeho koncem. Rozdíl mezi těmito hodnotami (ΔI) se vynáší v závislosti na vkládaném potenciálu (obrázek 5B). Tento postup umožňuje eliminaci negativního vlivu kapacitního proudu, a tedy zvýšení citlivosti stanovení látek oproti klasickým bezpulzním voltametričtým technikám. Výstupem analýzy je voltametričtý pik, jehož výška je úměrná koncentraci analytu. Detekční limity se pohybují v řádech 10^{-8} mol/l. Potenciál píku (E_p) se blíží hodnotě $E_{1/2}$ a může sloužit k identifikaci

látek. Rozlišit lze látky, jež se liší hodnotou E_p o 50 mV a více (Henze, 2000, Kounaves, 1997).



Obrázek 5 Závislost potenciálu vkládaného na elektrodu na čase pro DPV (A) a SWV (B) a výsledný DP (C) resp. SW (D) voltamogram (Opekar, 2002)

1.1.2.4 Square wave voltametrie

Square wave voltametrie (SWV – Square wave voltammetry) se řadí mezi velmi citlivé elektroanalytické metody. Potenciál vkládaný na elektrodu se mění lineárně s časem a je modulován střídavým napětím pravoúhlého tvaru (obrázek 5B). Proud se měří vždy ke konci každého vloženého pulzu. Zaznamenává se stejně jako v případě DPV závislost rozdílu dvou po sobě změřených hodnot proudu na potenciálu elektrody. Měřené závislosti mají tvar píky. SWV se stejně jako DPV vyznačuje malým nabíjecím proudem díky uvedenému způsobu měření, a tedy vyšší citlivostí než klasická DCV (Vargus, 2007, Osteryoung, 1985).

1.1.2.5 Rozpouštěcí voltametrie

Rozpouštěcí voltametrie (SV – Stripping voltammetry) je metodou, která se využívá nejčastěji při detekci a kvantitativním stanovení kovů nebo jejich komplexů. Jedná se o extrémně citlivou elektrochemickou techniku. Stanovení elektroaktivních složek se provádí při jejich elektrolytickém rozpouštění.

Metoda rozpouštěcí voltametrie zahrnuje dva kroky. Nejprve dochází k nahromadění rozpuštěného analytu na povrch pracovní elektrody při konstantním potenciálu. V dalším kroku dochází k rozpuštění nahromaděné látky z povrchu elektrody. Tento proces se již zaznamenává. Hlavní výhodou rozpouštěcí voltametrie jsou extrémně nízké detekční limity, dají se stanovovat látky o koncentraci 10^{-9} až 10^{-12} mol/l.

Mezi rozpouštěcí metody patří: anodická, katodická a adsorpční rozpouštěcí voltametrie (Allen J. Bard, 2001, Ozkan, 2012, Scholz, 2010).

- *Anodická rozpouštěcí voltametrie* (ASV – Anodic stripping voltammetry) je nejčastěji využívanou metodou v praxi pro stanovení stopového množství kovů ve vzorku. Kationty kovu jsou redukovány v prekoncentračním kroku a vylučovány na povrch pracovní elektrody pomocí katodického potenciálu. Vložením anodického potenciálu dochází k odstranění analytu z elektrody, probíhá oxidace, tzv anodické rozpouštění analytu zpět do roztoku elektrolytu (Scholz, 2015, Copeland, 1974).
- *Katodická rozpouštěcí voltametrie* (CSV – Cathodic stripping voltammetry) je technika vhodná pro stanovení oxidů a solí rtuti. Rozdíl mezi ASV a CSV není veliký. U katodické rozpouštěcí voltametrie dochází k rozpuštění málo rozpustné sloučeniny, která je nahromaděna na povrchu elektrody, katodickým (redukčním) procesem do roztoku elektrolytu. Citlivost metody závisí na rozpustnosti nahromaděných solí (Scholz, 2005, Scholz 2015).
- *Adsorpční rozpouštěcí voltametrie* (AdSV – Adsorptive stripping voltammetry) je založena na adsorpci analyzovaných látek na povrchu elektrody a jejich následné oxidaci nebo redukcí (Kalvoda, Berek, 2007).

1.1.3 Pracovní elektrody

1.1.3.1 Rtuťové elektrody

Rtuť je vynikajícím elektrodovým materiálem vhodným pro analýzu redoxních procesů organických i anorganických sloučenin. Rtuťová elektroda se vyznačuje vysokým přepětím vodíku v záporné potenciálové oblasti. Poskytuje dokonale hladký, snadno obnovitelný povrch, což vede k dosažení vysoce reprodukovatelných výsledků. Její nevýhodou je omezený využitelný rozsah v oblasti pozitivního potenciálu, špatná mechanická odolnost a toxicita (Ozkan, 2012).

V elektrochemii se využívá několik typů rtuťových elektrod:

- *Kapající rtuťová elektroda* (DME) se skládá z přibližně 12 až 20 cm dlouhé kapiláry s vnitřním průměrem okolo 30-50 μm a je napojena na zásobník rtuti. Přirozená doba kapky je v rozmezí 3-10 s a dá se měnit výškou sloupce rtuti posunem zásobníku. Rtuť prochází skrz kapiláru a vytváří sférickou kapku o průměru 1 mm, která v pravidelných intervalech svojí vahou padá do analyzovaného roztoku (Gulaboski, 2008, Allen J. Bard, 2001). Dochází tak k pravidelnému obnovování povrchu elektrody v průběhu měření a tím k eliminaci problémů s pasivací. Nevýhodou je velká spotřeba rtuti.
- V případě *visící rtuťové kapkové elektrody* (HMDE) je odkapávání kapky řízeno elektronicky, čímž se zajistí lepší reprodukovatelnost výsledků. Na rozdíl od DME se velikost kapky v průběhu měření nemění. Celá analýza probíhá na jedné rtuťové kapce. Po skončení analýzy se kapka odkápne a vytvoří se nová. Další měření tak probíhá na čistém povrchu nepoznamenaném předchozími experimenty (Ozkan, 2012).
- *Rtuťová filmová elektroda* (MFE) je připravena přetažením vhodného inertního substrátu tenkou vrstvou kovové rtuti. Rtuťový film se vylučuje elektrolýzou z roztoku obsahujícího ionty rtuti. Na většině substrátů se rtuť neukládá jako souvislý film, ale tvoří se kapičky rtuti, jejichž velikost závisí na potenciálu elektrody. Mezi substrátové materiály patří uhlík (skelný uhlík, uhlíková pasta) nebo ušlechtilé kovy (stříbro, zlato a platina). Nevýhodou kovových substrátů může být, že se do jisté míry rozpouští ve rtuti. Nejčastěji se proto používá uhlík, kvůli jeho chemické inertnosti, širokému rozsahu potenciálu i nízkým nákladům. MFE

má široké uplatnění v rozpouštěcích technikách, při stanovení stopového množství kovů (Economou, Fielden, 2003, Yosypchuk, Fojta, 2010).

Alternativou ke rtuťovým elektrodám jsou pevné amalgámové elektrody (Novotný a Yosypchuk, 2000), z nichž se nejčastěji používá stříbrná pevná amalgámová elektroda (AgSAE). Její příprava je jednoduchá a lze ji připravit v laboratoři. Skleněná trubička naplněná práškovým stříbrem se na několik hodin ponoří do kapalné rtuti za vzniku netoxického amalgámu, který je mechanicky stabilní. Leštěním vzniklého amalgámu vznikne nová pracovní elektroda, šetrná k životnímu prostředí, která neobsahuje kapalnou rtuť a její elektrochemické vlastnosti jsou podobné rtuťovým elektrodám. Výhodou je vedle nízké toxicity, snadná manipulace a chemická i mechanická odolnost. Nevýhodou oproti HMDE je horší obnovitelnost povrchu, riziko pasivace a s tím spojená horší opakovatelnost výsledků (Vyskočil, 2010, Yosypchuk, 2009). Ze stříbrného amalgámu byly v minulosti připraveny rovněž kompozitní (Yosypchuk, 2007) nebo pastové elektrody (Yosypchuk, 2008). Vedle stříbra lze použít pro přípravu elektrodového materiálu i jiné kovy, např. měď nebo iridium (Yosypchuk, 2003).

1.1.3.2 Pevné elektrody

Pevné elektrody jsou vyrobeny z tuhého materiálu (ušlechtilý kov, uhlík). Velmi důležitým faktorem při používání pevných elektrod je závislost odezvy na stavu povrchu elektrody. Během měření se na jejich povrchu mohou adsorbovat látky z roztoku, a protože nedochází k obnově povrchu pevných elektrod, výsledky bývají zpravidla hůř opakovatelné než u rtuťových kapkových elektrod. Povrch těchto elektrod je třeba mezi jednotlivými měřeními čistit. Lze využít mechanické leštění nebo zařazení různých elektrochemických regeneračních procesů (Swain, 2007).

Pevné pracovní elektrody jsou oproti rtuťovým elektrodám mechanicky stabilnější, poskytují širší využitelný rozsah v oblasti pozitivních potenciálů. Toho lze využít při analýze látek prostřednictvím jejich oxidace. V oblasti negativních potenciálů jsou obvykle méně vhodné. Potenciálový rozsah závisí na materiálu elektrody, rozpouštědle, základním elektrolytu a pH studovaného roztoku (Ozkan, 2012).

Mezi nejrozšířenější uhlíkové elektrody patří elektroda ze skelného uhlíku (GCE) nebo uhlíková pastová elektroda.

- *Elektroda ze skelného uhlíku* (GCE – Glassy carbon electrode) je nejčastěji využívanou uhlíkovou elektrodou. Skelný uhlík má vlastnosti podobné sklu a je nepropustný pro plyny a kapaliny. Jedná se o typ negrafitového uhlíku, který vzniká pyrolýzou vhodného polymeru (například fenolové pryskyřice) při teplotách okolo 1000 °C a pod tlakem, za vytvoření konjugované uhlíkové mikrostruktury (Youngmi Yi, 2017). Elektroda se obvykle aktivuje mechanickým leštěním. Výhodami GCE je široký potenciálový rozsah, chemická inertnost, dobrá elektrická vodivost, vysoká tvrdost a nízká reaktivita nebo jak již bylo napsáno nepropustnost pro plyny a kapaliny. Na druhou stranu nevýhodou je oxidace uhlíku při vysokých anodických potenciálech, která následně může zhoršit stav elektrody a ovlivnit tak výsledky analýzy (Swain, 2007, Dekanski, 2000).
- *Uhlíková pastová elektroda* (CPE – Carbon paste electrode) byla vynalezena na konci 50. let 20. století. Je tvořena směsí elektricky vodivého práškového uhlíku s velikostí částic 0,01-0,02 mm a elektricky nevodivým, ve vodě nerozpustným, kapalným pojivem (parafinový olej, silikonový olej nebo bromoform). Největší výhodou pastových elektrod je možnost odstranění použité pasty vytlačení z kapiláry a otřením např. filtračním papírem. Další analýza může probíhat na čistém povrchu, čímž jsou omezena rizika spojená s pasivací. Uhlíkovou pastovou elektrodu lze modifikovat přidávkem různých látek přímo do pasty při její přípravě. Tím lze docílit zlepšení její citlivosti, selektivity a ochrany jejího povrchu před nežádoucími reakcemi (Kalcher, 1990).

Elektrody z ušlechtilého kovu (platina, zlato...) patří mezi vysoce aktivní elektrody za definovaných elektrochemických podmínek. Výhodou je vysoká vodivost, nízký proud pozadí a široký potenciálový rozsah. Nevýhodou je tvorba oxidových vrstev na povrchu elektrody nebo rozpouštění kovů. Tyto vrstvy mohou změnit kinetiku přenosu elektronu a ovlivnit výsledky měření. Nejpoužívanějšími kovovými elektrodami jsou platinová a zlatá. Obvykle jsou zkonstruovány ve formě drátku nebo malých disků. Platinová a zlatá elektroda mají široký rozsah využitelného anodického potenciálu, ale malý rozsah v oblasti katodického potenciálu, který se kvůli nízkému přepětí vodíku pohybuje v rozmezí $-0,2$ a $-0,5$ V. Dále záleží na pH roztoku. Zlatá elektroda je oproti platinové méně náchylná k tvorbě oxidových vrstev na povrchu a k jeho kontaminaci (Uslu, Ozkan, 2007).

Kovové i uhlíkové elektrody lze elektrochemicky nebo chemicky modifikovat pro zlepšení jejich vlastností. Modifikované elektrody se liší od běžných úpravou povrchu nanesením

tenké vrstvy určitého materiálu. Touto úpravou získá elektroda požadované chemické, elektrochemické nebo elektrické vlastnosti. Dále dochází ke zlepšení selektivity nebo citlivosti elektrody (Kutner, 1998, Albery, 1981).

1.1.4 Borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE)

Diamant se řadí mezi nejtvrďší přírodní minerály a jedná se o krystalickou formu uhlíku. Mezi jeho významné fyzikální a chemické vlastnosti patří vysoký elektrický odpor, vysoká tepelná vodivost či odolnost proti korozi, chemická inertnost nebo optická transparentnost. Díky těmto vlastnostem má široké uplatnění v technických oborech. Struktura diamantu je uspořádána v krychlové mřížce. Mřížka je tvořena čtyřboce vázanými sp^3 hybridizovanými uhlíky, přičemž je každý uhlík navázán ke čtyřem sousedním atomům uhlíku. Tím se liší od jiných forem uhlíku jako je např. grafit (Swain, 1993).

Jak již bylo zmíněno, diamant slouží díky vysokému elektrickému odporu jako izolátor a je nutné ho upravit dopováním jiného prvku. Nejčastěji se používá jako příměs k výrobě vodivých diamantových elektrod bor, protože má nízkou aktivační energii nosiče náboje 0,37 eV. Lze použít i příměs fosforu, jehož aktivační energie nosiče náboje je 0,6 eV, dusíku (1,6-1,7 eV) nebo síry. Síru je možné zavádět do diamantu pouze společně s borem (Svítková, 2016, Luong, 2009).

Dopované diamantové elektrody lze rozdělit na 4 typy:

- dopované diamantové filmy se nanášejí přímo na substrát. Substrátem obvykle bývá monokrystalický nebo polykrystalický křemík, kov (wolfram, titan nebo molybden) nebo uhlíkaté materiály,
- mezi diamantovým filmem a kovovým substrátem se nachází mezivrstva vyrobená z odpovídajícího karbidu kovu, která zlepšuje adhezi diamantového filmu k substrátu a chrání kovový substrát před usazováním plynného vodíku,
- dopovaná elektroda je tvořena z diamantových částic,
- diamantové částice jsou imobilizované ve filmu (Luong, 2009, Nidheesh, 2019).

Dopovaný diamantový materiál lze vyrobit nejčastěji dvěma způsoby. Prvním způsobem je chemická depozice par (CVD) diamantu s dopantem za vzniku tenkého filmu. Přirozené diamantové filmy mají na svém povrchu monovrstvu vodíku, který je získán při depozici. K depozici se nejčastěji používá plynná směs methanu a vodíku. Přičemž atomový vodík

zabraňuje depozici nediamantových uhlíkových struktur. V plynné směsi se nachází také diboran nebo oxid boritý, jako zdroj boru. Druhou možností je výroba dopovaných diamantových částic vysokým tlakem a teplotou (HPHT). Kromě výše zmíněných existují další metody výroby, např. vakuové žíhání a povrchový doping nedopovaného diamantu (Pleskov, 2002, Nidheesh, 2019).

Ve srovnání s ostatními elektrodoými materiály, nedochází na povrchu elektrody z borem dopovaného diamantu (BDDE) k tvorbě a redukci oxidů mezi katodickým vývojem vodíku a anodickým vývojem kyslíku. BDDE mají mnoho vynikajících vlastností, včetně širokého potenciálového okna ve vodných a organických roztocích, jehož rozsah je přibližně 3 - 3,5 V, nízkého a stabilního kapacitního proudu pozadí, vysoké reprodukovatelnosti a dlouhodobé stability odezvy, dobré biokompatibility, odolnosti proti pasivaci nebo mechanické odolnosti. Tyto vlastnosti umožňují její široké uplatnění v různých oblastech (Compton, 2003, Svítková, 2016).

Vlastnosti BDD filmů jsou ovlivněny množstvím dopovaného boru, defekty filmu, přítomností nečistot a povrchovým zakončením (kyslíkem, vodíkem). Tyto vlastnosti závisí na metodě přípravy filmu elektrody a jeho elektrochemické předúpravě, tzv. terminaci (O-, H-terminace). K O-terminaci nebo H-terminaci povrchu dochází při katodické či anodické předúpravě. Povrch zakončený vodíkem je hydrofobní a relativně pasivní. H-terminace se provádí při vysokých negativních potenciálech ($< -2,0$ V) v oblasti vývoje vodíku. Dále povrch zakončený vodíkem vzniká při působení vodíkové plazmy nebo během postupu CVD metody. Naopak oxidovaný povrch nesoucí kyslíkaté funkční skupiny je hydrofilní a stabilnější (Pleskov, 2002, Yu, 2012). U anodické předúpravy jde o zavedení atomů kyslíku do povrchu BDD prostřednictvím reakce uhlíku s OH radikály. Povrch zakončený kyslíkem lze snadno vytvořit například varem v silné kyselině nebo vystavením vysokému anodickému potenciálu ($> +2,0$ V) v oblasti rozkladu vody. Tvorba radikálů způsobuje oxidaci a stabilizaci povrchu elektrody. Na povrchu elektrody pak převažují etherové vazby, ketonové, alkoholové nebo karboxylové skupiny důsledkem interakcí radikálů s povrchem BDD (Zavázalová, Barek, 2014, Baluchová, 2019). Údržba elektrody s H-terminací je náročnější kvůli snadné oxidaci vzdušným kyslíkem nebo elektrochemickou oxidací. Proto musí být katodická předúprava provedena těsně před daným experimentem. Anodická předúprava je prevencí před znečištěním elektrody.

Zjišťování kvality povrchu BDDE se provádí pomocí elektroluminiscence, Ramanovy spektroskopie a skenovací elektronové mikroskopie (Luong, 2009). Při zjišťování elektrochemických vlastností elektrody se využívá cyklická voltametrie reverzibilních redoxních systémů, např. $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4+}$. K charakterizaci diamantového filmu dopovaného borem se používá rozdíl potenciálu katodického a anodického píku. S rostoucím množstvím dopovaného boru ve filmu elektrody dochází obvykle ke zúžení potenciálového okna (Nidheesh, 2019).

Vzhledem k výjimečným elektrochemickým vlastnostem je BDDE široce využitelná v oblasti elektroanalytické chemie. Její analytické aplikace jsou popsány v mnoha přehledových člancích (Baluchová, 2019, Fujishima, 2006, Swain, 1998, Xu, 1997, Kraft 2007). Pomocí BDDE byla doposud zkoumána zejména řada oxidovatelných organických látek. Jedná se o farmaka (ibuprofen, kyselina askorbová, antipsychotika), různé potravinové složky, látky znečišťující životní prostředí (polycyklické aromatické uhlovodíky, pesticidy), ale i biomolekuly (cukry) (Pecková, 2009, Lourencao, 2020).

1.1.4.1 Modifikované BDDE

Jak již bylo uvedeno výše, pro zlepšení vlastností (selektivity a citlivosti) lze elektrody modifikovat např. kovovými nanočásticemi, uhlíkovými nanomateriály, polymery nebo biopolymery, enzymy apod. (Brillas, 2011). V posledních letech byly testovány rovněž možnosti modifikace BDDE. Tyto povrchy mohou být upraveny plazmovým zpracováním, iontovou implantací, elektrochemickou depozicí kovů a jejich oxidů ve formě nanočástic, povrchovou oxidací nebo navázáním různých organických molekul a biomolekul (Musilová, 2009, Toghil, 2010).

Modifikace BDDE kovovými nanočásticemi způsobí zvýšení aktivní povrchové plochy, lepší difúzi a může vést k citlivosti elektrody na analyt, který by na čisté elektrodě nebyl pozorován. Může také usnadnit přenos elektronů díky snížení aktivačního potenciálu u analytu. Nejčastějšími metodami modifikace jsou elektrochemická depozice kovů a iontová implantace. Elektrochemická depozice je velice přizpůsobivá na širokou oblast substrátů a je jednoduchá, rychlá a dá se provádět při pokojové teplotě (Compton, 2003, Einaga, 2004). Elektrochemická depozice se provádí ponořením elektrody například do roztoku H_2SO_4 o určité koncentraci obsahujícího CuSO_4 . Depozice se provádí při vhodném potenciálu po určitou dobu. Nejčastěji se vylučují kovy jako je kobalt, nikl, měď, zlato apod. Iontová

implantace je komplikovanější. Dochází k bombardování povrchu BDD těžkými ionty kovu. Daný typ kovu je implantován při napětí okolo 800 keV a modifikovaný povrch BDDE je následně žíhán při vysokých teplotách v přítomnosti vodíku (Toghill, 2011).

BDDE lze kromě kovů upravit pomocí různých forem uhlíkových nanomateriálů, např. uhlíkových nanotrubiček (MWCNT - multiwalled carbon nanotubes) nebo β -cyklodextrinem (β -CD). MWCNT je vhodným modifikátorem, který zajišťuje zlepšení přenosu elektronů mezi povrchem elektrody a biologickou složkou, dále zajišťuje významné zvětšení povrchu BDDE. MWCNT-BDDE se připravuje např. pomocí ethanolické suspenze MWCNTs a NAFION, která se pomocí pipety nakape na povrch BDDE. Následně dojde k sušení elektrody na vzduchu při pokojové teplotě. Takto připravenou elektrodu lze ještě upravit např. molekulami β -CD, které jsou akumulovány na povrchu elektrody optimalizovaným depozičním potenciálem a časem. Elektroda je snadno připravitelná, šetrná k životnímu prostředí, levná, citlivá a snadno použitelná. Využívá se např. při stanovení pesticidů (Brycht, 2018).

Další možností je příprava tzv. biosenzorů, kdy elektrody mohou být zakončeny aminem nebo karboxylovou skupinou, na které může být přímo imobilizován enzym (například tyrosináza, glukosooxidáza). Zavedení aminoskupiny se provádí fotochemickou reakcí aminových molekul mechanismem volných radikálů nebo chemickou modifikací oxidovaného BDD povrchu s triethoxysilanem. Karboxylové skupiny na povrchu elektrody vznikají fotochemickou reakcí. Připravené skupiny slouží jako vazebná místa pro připojení konkrétního enzymu nebo jiné biomolekuly (Yu, 2012). Příkladem je imobilizace enzymu glukosooxidázy na povrch oxidované BDDE obsahující karboxylovou skupinu, a to pomocí adsorpce (Luong, 2009).

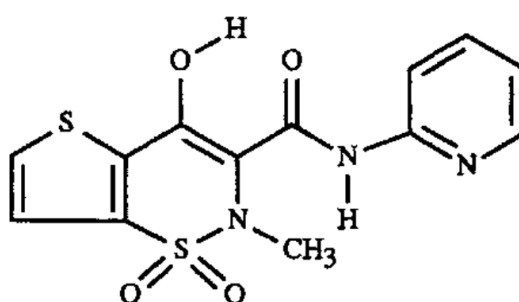
Možností, jak modifikovat povrch BDDE pro konkrétní elektroanalytické aplikace bylo v literatuře popsáno mnoho a jsou rovněž shrnuty v řadě přehledových článků (Svítková, 2016, Ivandini, 2004, Toghill, 2010)

1.2 Tenoxikam

Tenoxikam (4-hydroxy-2-methyl-3-[N-(2-pyridyl)karboxamido]-2-H-thieno[2,3-e]1,2-thiazin-1,1-dioxid, $C_{13}H_{11}N_3O_4S_2$) je nesteroidní protizánětlivé léčivo (NSAID - Nonsteroidal anti-inflammatory drugs), patřící do skupiny oxikamů (Pudchem, 2011).

Oxikamy strukturálně patří do podskupiny sloučenin třídy 1,2-benzothiazinů, které poprvé syntetizoval Braun v roce 1923. Většina NSAID obsahuje ve své struktuře karboxylovou kyselinu. Naopak oxikamy obsahují enolové kyseliny 4-hydroxy-1,2-benzothiazin-3-karboxamidových derivátů. První oxikam byl syntetizován v 50. letech minulého století, ale nebyla u něj prokázána protizánětlivá aktivita. Různými syntézami a pokusy došlo k objevu piroxikamu. Dále docházelo k objevu dalších léčiv z této skupiny, jako jsou meloxicam, lornoxicam, isoxicam a tenoxicam. Oxikamy patří do skupiny nesteroidních protizánětlivých a protirevmatických léčiv (Xu, 2014, Olkkola, 1994).

Strukturální vzorec tenoxikamu je uveden na obrázku 6. Tenoxicam se vyznačuje dlouhým poločasem setrvání v krevní plazmě. Více než 90 % léčiva se váže na bílkoviny lidské plazmy. Má silné protizánětlivé, antipyretické a analgetické vlastnosti. Je podáván pacientům s revmatoidní artritidou, osteoartrózou, poraněnými svaly a klouby, a to jak ve formě tablet (orálně) a čípků (rektálně), tak ve formě injekcí do svalů, žíly nebo kloubu. Mechanismem účinku je reverzibilní inhibice cyklooxygenázy (COX - 1 a COX - 2) v místě poranění tkáně, která vede ke snížení tvorby prostaglandinů (Al-Obaid, 1993, Roelofse, 1996). Poprvé byl tenoxicam uveden na trh v březnu 1987 (Katzmann, 1990).



Obrázek 6 Strukturální vzorec tenoxikamu (Tsai, 1993)

1.2.1 Fyzikálně chemické vlastnosti tenoxikamu

Tenoxicam je žlutý krystalický prášek, citlivý na světlo, téměř bez zápachu, s molekulovou hmotností 337,37 g/mol. Jedná se o slabou kyselinu s hodnotami pKa 5,34 a 1,07. Bod tání

tenoxicamu se pohybuje v rozmezí 209–213 °C. Ve vodě je málo rozpustný, jeho rozpustnost je 0,45 mg/ml. Rozpouští se převážně v organických kyselinách a zásadách (Nilsen, 1994, český lékopis, 1997).

1.2.2 Mechanismus účinku

Tenoxicam selektivně inhibuje syntézu prostanglandinů inhibicí cyklooxygenázy (COX), která katalyzuje tvorbu cyklických endoperoxidáz z kyseliny arachidonové (Gonzales, 1987). COX existuje ve dvou formách: konstitutivní COX - 1, která je zodpovědná za bazální syntézu prostanglandinů účastnících se fyziologických procesů. COX - 1 je exprimována konstitutivně a je všudypřítomně distribuována. Druhou formou je COX - 2 zodpovědná za produkci prostanglandinů během zánětu a patologických situací. Většinou chybí nebo je přítomna v nízkých hladinách v neproliferujících buňkách (Lora, 1997).

Mechanismem účinku je soutěž tenoxicamu (i jiných NSAID) se substrátem, kyselinou arachidonovou, o aktivní místa na enzymu. Dochází k pomalu se rozvíjející nevratné strukturální změně enzymu. Tenoxicam především nevratně inhibuje COX - 2, ale i COX - 1. Inhibicí COX - 1 dochází k vedlejším účinkům tenoxicamu, ale tato inhibice je dočasná a částečně vratná (Vane, 1996). Dalším možným mechanismem protizánětlivého účinku je zachycení aktivních kyslíkových radikálů, inhibice funkcí leukocytů včetně fagocytózy a uvolňování histaminu v místě zánětu (Todd, 1991). Tenoxicam je zcela metabolizován v játrech na neaktivní metabolity. Z velké části se metabolity vylučují močí ve formě 5-hydroxytenoxicamu. Zbytek se vylučuje žlučí ve formě 6-O-glukuronidu tenoxicamu (Al-Obaid, 1993).

Během léčby je tenoxicam dobře snášen u většiny pacientů. U některých pacientů se však objevily vedlejší účinky jako je nevolnost, poruchy trávení, zvýšené riziko selhání ledvin nebo krvácení. Při vyšších dávkách může dojít k daleko závažnějším vedlejším účinkům, které postihují játra a žlučové cesty za vzniku hepatitidy. Doporučenou denní dávkou je 20 mg. U akutních případů se dávka navyšuje na 40 mg jednou denně po dobu 2 dnů a následně se sníží na 20 mg po dobu 5 dnů. Průměrný eliminační čas léčiva je okolo 67 až 75 hodin (Gonzalez, 1987, Ammar, 2011).

1.2.3 Stanovení tenoxikamu s využitím různých instrumentálních metod

Stanovení tenoxikamu ve farmaceutických a biologických vzorcích, se provádí pomocí různých instrumentálních metod. Nejběžněji používanou analytickou metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) spojená s UV detekcí (Jaramillo, 1993), amperometrickou detekcí, nebo hmotnostní spektrometrií (Chandel, 2012). Dalšími způsoby stanovení jsou spektrofotometrické a spektrofluorimetrické metody (Ries, 1998). Uvedené metody ovšem mohou mít nevýhody, jako je nedostatečná citlivost, instrumentálně náročné a nákladné vybavení, časově náročná a složitá úprava vzorků apod. Vhodnou alternativou mohou být elektrochemické metody, které jsou instrumentálně méně náročné, jednoduché a rychlé, obvykle nevyžadují komplikované postupy úpravy vzorku před analýzou a umožňují dosažení vysoké citlivosti (Chandel, 2012, Ji, 2005).

1.2.4 Voltametrické stanovení tenoxikamu

Doposud existuje jen několik studií zaměřených na stanovení tenoxikamu elektrochemicky. Někteří autoři se zabývali stanovením tenoxikamu pomocí diferenční pulzní voltametrie se statickou rtuťovou kapkovou elektrodou (SMDE) a HMDE ve farmaceutických přípravcích a v krvi. Měření bylo prováděno ve fosfátovém pufru o pH 5,3 a redukční signál byl dobře vidět při potenciálu $-1,3$ V. Lineární dynamický rozsah (LDR) navržené metody byl v rozmezí $0,025$ – 20 mg/ml a limit detekce (LOD) 25 ng/ml ($7,4 \times 10^{-8}$ mol/l) (Atkopar, 1996, Özaltın, 2000). V další práci bylo popsáno stanovení tenoxikamu a piroxikamu opět s využitím HMDE v kombinaci s rozpouštěcí square wave voltametrií (SWV), kdy byl prezentován LOD $1,0 \times 10^{-10}$ mol/l (El-Maali, 1990). Na elektrokatalytické redukci tenoxikamu s využitím GCE modifikované kyselinou 4-aminobenzensulfonovou byla založena další metoda jeho stanovení. Autoři pracovali v prostředí acetátového pufru (pH 5) a použili DPV. Dosáhli hodnoty LOD $2,82 \times 10^{-7}$ mol/l. Metodu aplikovali při analýze tablet farmaceutického přípravku (Sadikoglu, 2019).

Oxidační chování tenoxikamu bylo studováno na GCE modifikované uhlíkovými nanotrubicemi (MWCNT/GCE). Měření bylo prováděno v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru o pH 5. Bylo zjištěno, že tenoxikam poskytuje jeden oxidační signál kolem potenciálu $+0,55$ V. Autoři uvádějí LDR 2×10^{-7} až 1×10^{-5} mol/l a LOD $1,43 \times 10^{-9}$ při použití DPV. Oxidační signál byl v této práci přiřazen oxidaci amidové skupiny ve struktuře tenoxikamu. Tento závěr ovšem nebyl potvrzen žádnou objektivní metodou, jako např. analýzou produktů

elektrolýzy (Agin, 2019). Naopak Bozal a kol. studovali voltametrické chování lornoxicamu, piroxicamu, tenoxicamu a meloxicamu na GCE a na základě porovnávacích studií přiřadili oxidační signál oxikamů kolem potenciálu +0,7 V oxidaci hydroxylové skupiny na triazinovém kruhu (Bozal, 2010). V práci (Šelešovská, 2019) bylo studováno oxidační chování meloxicamu, který poskytuje na rozdíl od ostatních oxikamových léčiv 2 oxidační signály. První pík odpovídá potenciálem (+0,7 V) signálům ostatních oxikamů a jedná se tedy s největší pravděpodobností o stejný děj. Druhý pík meloxicamu se nachází při výrazně pozitivnějším potenciálu. V rámci této práce byla provedena preparativní elektrolýza analytu a produkty elektrolýzy byly analyzovány a identifikovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Bylo zjištěno, že první oxidační krok odpovídá oxidaci hydroxylové skupiny a až při pozitivnějších potenciálech dochází k oxidaci amidové skupiny. Na základě těchto výsledků lze říci, že oxidační signál pozorovaný u tenoxicamu může být rovněž přiřazen oxidaci hydroxylové skupiny. Ke stejnému závěru došli autoři také pro piroxikam, když izolovali a analyzovali produkty jeho oxidace (Torriero, 2006). Uhlíková pastová elektroda byla použita pro elektrochemickou charakterizaci tenoxicamu (Guzmán-Hernández, 2012).

V rámci této práce byla pro studium voltametrického chování a pro vývoj metody stanovení tenoxicamu využita borem dopovaná diamantová elektroda. Ta je díky svým výjimečným elektrochemickým vlastnostem perspektivním elektrodovým materiálem pro oblast elektroanalytické chemie.

2. Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

Během celého měření byly použity chemikálie pro přípravu standardů a elektrolytů čistoty p.a. Jako základní elektrolyt byl používán Brittonův-Robinsonův pufr (BRB) v rozmezí pH 2-12. Pro zajištění hodnoty pH okolo 1 byla použita HNO_3 o koncentraci 0,1 mol/l. BRB byl připravován smícháním kyselé a alkalické složky dle požadované hodnoty pH pod pH-metrem. Kyselé složka představovala roztok kyselin o koncentraci 0,4 mol/l připravený ředěním zásobních kyselin H_3PO_4 (85 %) a CH_3COOH (99 %) a rozpuštěním vhodné navážky pevné H_3BO_3 (vše Penta-Švec, Praha). Alkalická složka byla tvořena roztokem NaOH (Penta-Švec, Praha) o koncentraci 0,2 mol/l. Zásobní roztok tenoxicamu (Sigma-Aldrich) o koncentraci 1×10^{-3} mol/l byl připraven rozpuštěním dané navážky v roztoku acetonitrilu (Sigma-Aldrich, Praha) a uchováván v lednici bez přístupu světla. Roztoky o nižší koncentraci byly připravovány denně čerstvé ředěním zásobního roztoku základním elektrolytem. Vedle tenoxicamu byly stejným způsobem připravovány také roztoky dalších oxycamových léčiv meloxicamu, piroxicamu a lornoxicamu (Sigma-Aldrich). Pro analýzu praktických vzorků byly využity farmaceutické přípravky Flamexin 20 mg (účinná látka piroxicam, Chiesi Farmaceutici, Itálie), Meloxicam Mylan 15 mg (Generics, Velká Británie) a Xefo rapid 8 mg (účinná látka lornoxicam, Takeda, Rakousko).

2.2 Přístrojové vybavení

Voltametrická měření byla prováděna pomocí analyzátoru Autolab PGSTAT 30 potenciostat-galvanostat (obrázek 7, Metrohm Autolab, Nizozemí), řízeného počítačem se softwarem Nova 1.11, v tříelektrodovém uspořádání. Jako pracovní elektroda byla použita komerčně dostupná BDDE s aktivním povrchem $7,07 \text{ mm}^2$ a poměrem B/C během depozice 1000 ppm (Windsor Scientific, Velká Británie). Jako pomocná elektroda sloužil Pt drátek a nasycená argentchloridová elektroda ($\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$) sloužila jako referentní elektroda (obě Monokrystaly, Česká Republika). Vedle tohoto klasického uspořádání elektrochemického článku byly použity dva typy tištěných senzorů (SPE). Prvním byla komerčně dostupná SPE od firmy DropSens (Metrohm, Česká republika) s pracovní elektrodou z BDD ($9,07 \text{ mm}^2$), pomocnou uhlíkovou a referentní stříbrnou elektrodou. Druhým testovaným senzorem byla laboratorně připravená (LM) SPE dodaná kolegy ze skupiny M. Vojse ze Slovenské technické univerzity v Bratislavě. V tomto případě byla pracovní ($3,14 \text{ mm}^2$) i pomocná elektroda

z BDD a referenční elektroda byla stříbrná. Použité pracovní elektrody, resp. SPE senzory jsou uvedeny na obrázku 8.

Při přípravě roztoků o určitém pH byl použit stolní pH metr Fisher Scientific AB 150 (Fisher Scientific, Česká republika). Dále byly použity analytické váhy KERN ALS 120-4N (Kern a Sohn, Německo) pro navažování potřebných chemikálií a automatické pipety pro přesné dávkování roztoků. Pro lepší rozpouštění látek byla použita ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex (Schalltec GmbH, Německo). Všechna měření proběhla za laboratorní teploty (23 ± 2 °C).



Obrázek 7 Autolab PGSTAT 30 potenciostat-galvanostat se zapojeným tříelektrodovým elektrochemickým článkem v polarografické nádobce



Obrázek 8 Klasická BDDE (vlevo), SP/BDD (DropSens, uprostřed), LM-SP/BDD (STU, vpravo)

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Příprava BDDE

Na začátku každého pracovního dne, proběhla aktivace BDDE v roztoku základního elektrolytu (BRB o pH 2) změřením 20 cyklických voltamogramů. Aktivace proběhla od počátečního potenciálu ($E_{\text{poč}}$) -1000 mV do potenciálu obratu (E_{obratu}) $+2300$ mV při rychlosti polarizace (ν) 100 mV/s. Při práci s SPE senzory probíhala aktivace za stejných podmínek, ale bylo realizováno méně cyklů, konkrétně do reprodukovatelné odezvy. Mezi jednotlivými měřeními nebylo třeba zařazovat žádný regenerační krok, protože nedocházelo k pasivaci povrchu elektrod. Vzhledem ke snadné oxidaci povrchu BDDE, která probíhá i samovolně na vzduchu, byla veškerá měření prováděna na O-terminovaném povrchu.

2.3.2 Voltametrická měření

Voltametrické chování tenoxikamu na BDDE bylo zkoumáno pomocí metody cyklické voltametrie. Zaznamenávaly se závislosti získaných signálů na pH v rozsahu potenciálů od $E_{\text{poč}} = -1000$ mV po $E_{\text{obratu}} = +2300$ mV při $\nu = 100$ mV/s. Dále byl zjišťován vliv změny rychlosti polarizace na voltametrické chování tenoxikamu, kdy ν byla měřena v rozsahu $25-500$ mV/s a $50-500$ mV/s.

Při vývoji metody stanovení tenoxikamu byly testovány metody DPV a SWV. Měření probíhala v prostředí BRB o pH 2. Nejprve byly zjištěny optimální parametry obou metod, které jsou následující: DPV – $E_{\text{poč}} = +0$ mV, $E_{\text{kon}} = +2000$ mV, $\nu = 40$ mV/s, šířka pulzu = 20 ms a výška pulzu = $+90$ mV; SWV – $E_{\text{poč}} = +0$ mV, $E_{\text{kon}} = +2000$ mV, $\nu = 40$ mV/s, amplituda = $+50$ mV a frekvence = 30 Hz. Na základě porovnání získaných statistických parametrů byla pro stanovení tenoxikamu a poté i dalších oxycamových léčiv zvolena SWV.

Výšky píků byly vyhodnocovány spuštěním sviské přímky z maxima píku ke spojnici začátku a konce píku. Všechny grafy byly vytvořeny pomocí softwaru MS Excel 2010 (Microsoft, USA). Parametry kalibračních přímek a intervaly spolehlivosti byly vypočítány pomocí programu Project 1 (V. Jehlička, Česká republika). Limit detekce (LOD) byl vypočítán jako $3 \times$ směrodatná odchylka úseku vydělená směrnici kalibrační přímky a mez stanovitelnosti (LOQ) jako $10 \times$ směrodatná odchylka úseku vydělená směrnici kalibrační přímky.

2.3.3 Analýza farmaceutických přípravků

Vzhledem k tomu, že v České republice není dostupný žádný lék s tenoxicamem jako účinnou látkou, byly analyzovány farmaceutické přípravky obsahující další látky ze skupiny oxikamů. Vzhledem k výše uvedeným informacím o jejich elektrochemickém chování bylo možné aplikovat metodu vyvinutou pro stanovení tenoxicamu. Analyzovány tedy byly přípravky Xefo rapid s výrobcem deklarovaným obsahem lornoxicamu 8 mg na tabletu, Flamexin s obsahem piroxicamu 20 mg na tabletu a Meloxicam Mylan s obsahem meloxicamu 15 mg na tabletu (obrázek 9). Příprava vzorků k analýze probíhala ve všech případech stejně. Jedna tableta příslušného léku byla rozmělněna v třecí misce na jemný prášek a rozpuštěna ve 100 ml acetonitrilu. Pro lepší rozpouštění byl vzorek umístěn na 10 min. do ultrazvukové lázně. Měření probíhalo v polarografické nádobce v prostředí BRB (pH 2) o objemu 10 ml. K základnímu elektrolytu byl vždy pipetován vzorek léčiva tak, aby jeho výsledná koncentrace v polarografické nádobce byla přibližně 2×10^{-7} mol/l (vypočteno podle obsahu účinné látky deklarované výrobcem). Pro stanovení byla použita metoda standardního přídatku a vždy byly ke vzorku přidány minimálně dva přídatky standardního roztoku analytu o koncentraci 1×10^{-3} mol/l a objemu $V = 2 \mu\text{l}$. Měření bylo pro všechna analyzovaná léčiva provedeno 5×.

Pro každé léčivo byla následně z těchto měření vypočítána průměrná hodnota obsahu účinné látky v tabletě s příslušným intervalem spolehlivosti, relativní směrodatná odchylka opakovaného stanovení a výtěžnost vztažená k obsahu účinné látky deklarovanému výrobcem.

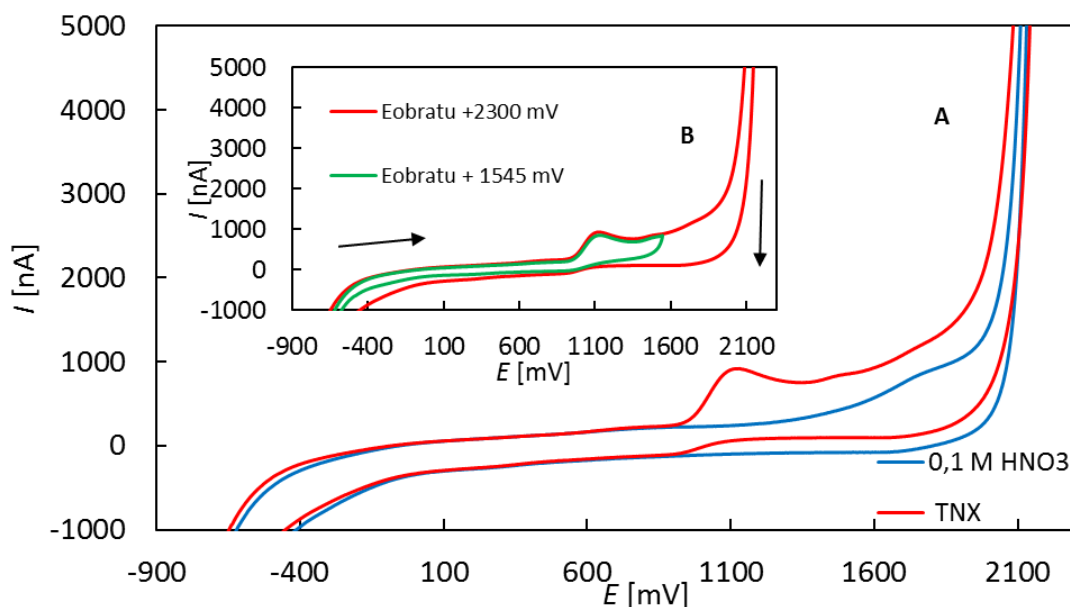


Obrázek 9 Analyzované farmaceutické přípravky Flamexin, Meloxicam Mylan a Xefo rapid

3. Výsledky a diskuse

3.1 Voltametrické chování tenoxikamu na BDDE

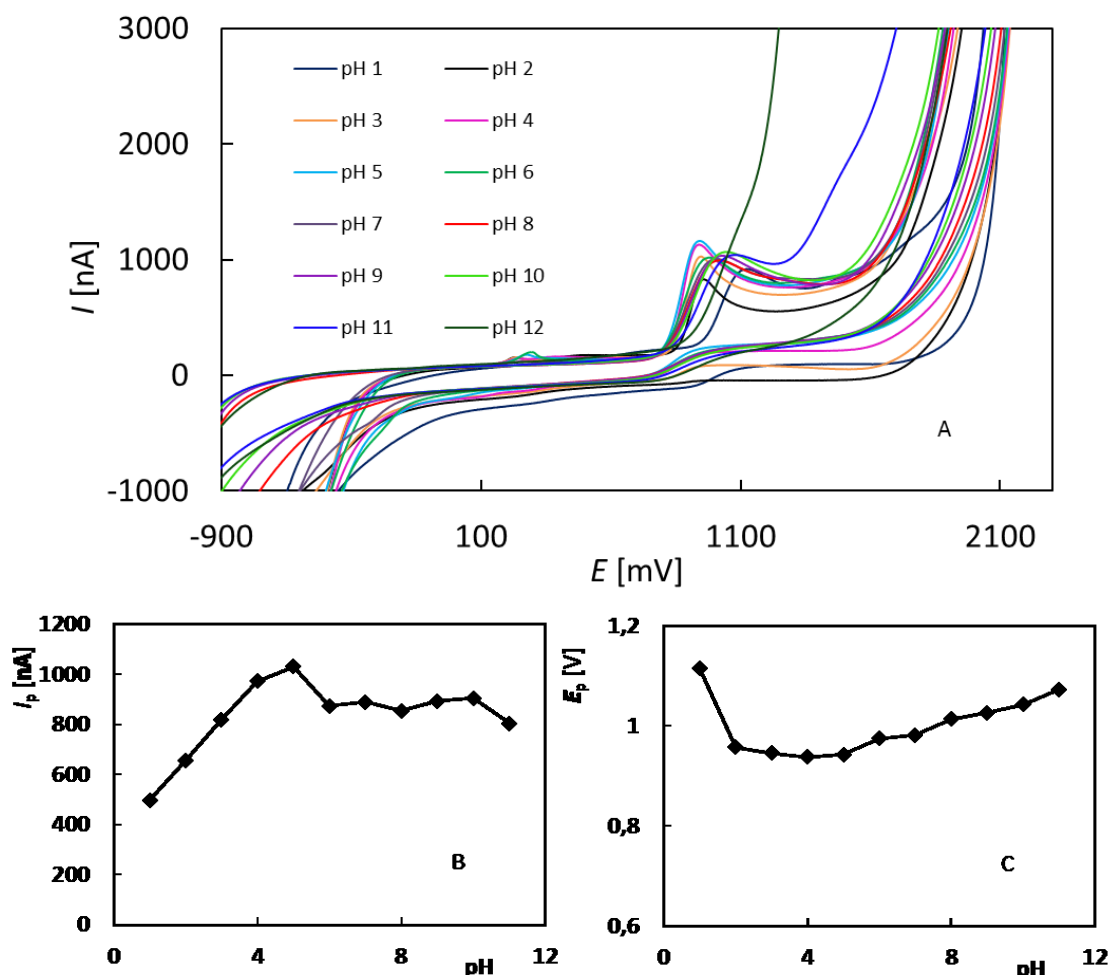
Na úvod experimentální části této diplomové práce, bylo studováno voltametrické chování tenoxikamu na BDDE. Nejprve byl změřen cyklický voltamogram tenoxikamu (dále bude označen zkratkou TNX) o koncentraci $5,0 \times 10^{-5}$ mol/l v prostředí HNO_3 ($c = 0,1$ mol/l). Toto prostředí bylo na úvod použito v souladu s literaturou (Šelešovská, 2019), kdy se potvrdilo, že meloxicam poskytuje dobře vyhodnotitelný anodický pík v kyselém prostředí. Měření probíhalo v rozsahu potenciálů od -1000 do $+2300$ mV, při $v = 100$ mV/s. Získaný voltamogram je uveden na obrázku 10A. Za uvedených podmínek poskytl TNX pouze 1 významný oxidační signál při potenciálu okolo $+1100$ mV. Tento pík by měl podle literatury odpovídat oxidaci hydroxylové skupiny (Šelešovská, 2019). Na katodické křivce nebyl zaznamenán žádný odpovídající katodický pík. V tomto případě se jedná o chemicky ireverzibilní elektrodovou reakci. Pro potvrzení tohoto závěru byl ještě změřen cyklický voltamogram TNX, kdy byl E_{obratu} změněn na hodnotu $+1545$ mV, byl tedy posunut těsně za pozorovaný anodický pík. Tím se zamezilo případným následným reakcím, které by mohly bránit zpětné redukci vznikajícího oxidačního produktu. Na vloženém záznamu na obrázku 10B je vidět, že ani v tomto případě nebyl zaznamenán žádný katodický pík a ireverzibilita sledované elektrodové reakce tak byla potvrzena.



Obrázek 10 A – Cyklický voltamogram TNX o koncentraci $5,0 \times 10^{-5}$ mol/l zaznamenaný na BDDE v prostředí HNO_3 o koncentraci $0,1$ mol/l ($E_{\text{poč}} = -1000$ mV, $E_{\text{obratu}} = +2300$ mV, $v = 10$ mV/s), **B** – cyklický voltamogram TNX po změně potenciálu obratu

3.1.1 Závislost voltametrického chování tenoxikamu na pH

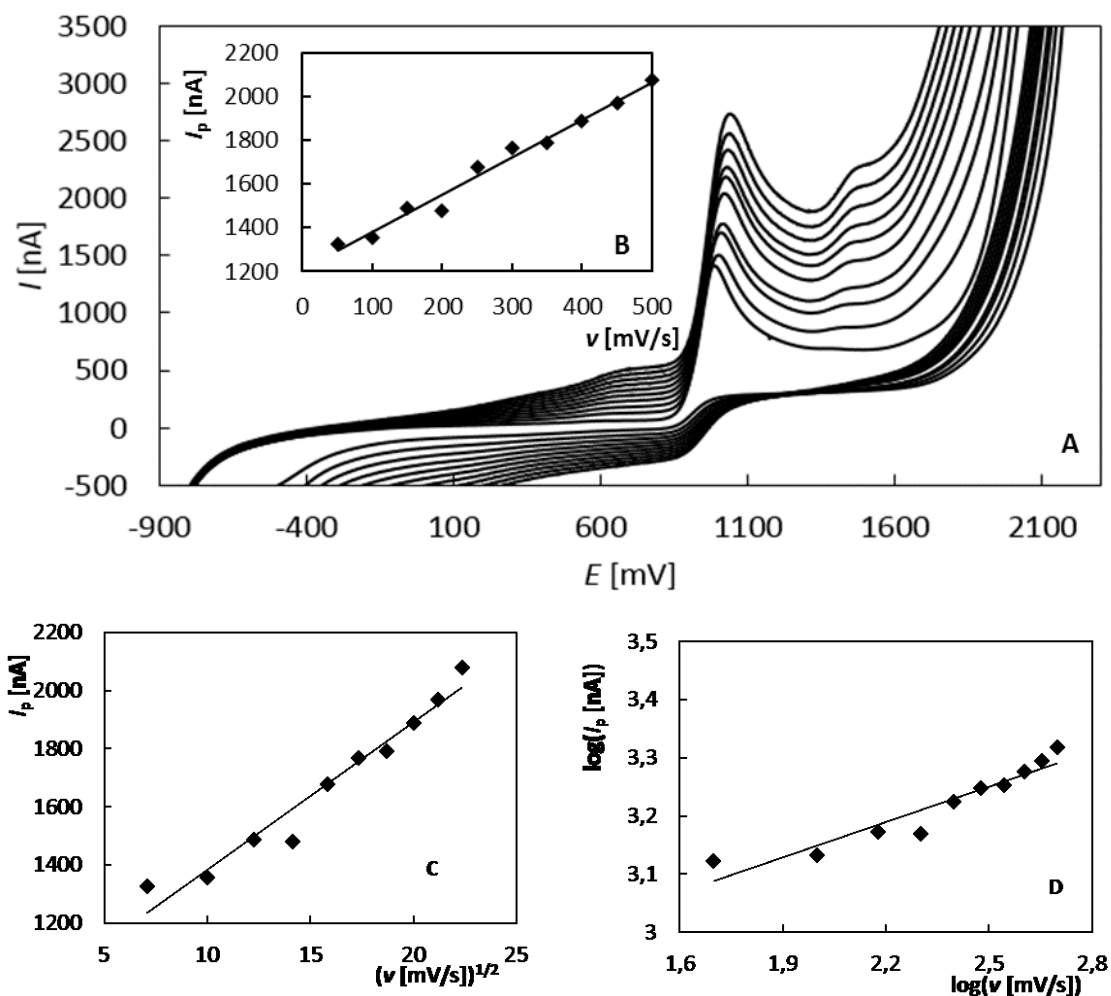
Je obecně známo, že významný vliv na velikost a tvar redoxních signálů látek má složení základního elektrolytu. Proto bylo v dalším experimentu studováno voltametrické chování TNX o koncentraci $5,0 \times 10^{-5}$ mol/l v závislosti na pH prostředí, a to opět pomocí CV s výše uvedenými parametry. Jako základní elektrolyt byl použit roztok HNO_3 o koncentraci 0,1 mol/l (pH \sim 1) a BRB o pH 2-12. Ve všech testovaných prostředích byl zaznamenán 1 oxidační signál TNX. Získané cyklické voltamogramy jsou uvedeny na obrázku 11A. Ze závislosti výšky (I_p) píku na pH na obrázku 11B je zřejmé, že s rostoucím pH narůstala proudová odezva a v neutrálním až alkalickém prostředí se její výška již příliš neměnila. V BRB o pH 12 nebylo možné pík TNX vyhodnotit. S narůstajícím pH docházelo rovněž k mírnému posunu potenciálu píku (E_p) směrem k pozitivnějším hodnotám (obrázek 11C). Výjimkou je prostředí HNO_3 , které se liší nejen hodnotou pH, ale i iontovou silou roztoku.



Obrázek 11 A – Cyklické voltamogramy TNX o koncentraci $5,0 \times 10^{-5}$ mol/l zaznamenané na BDDE v závislosti na pH prostředí, elektrolyt: HNO_3 (0,1 mol/l) a BRB (pH 2-12), $E_{poc} = -1000$ mV, $E_{obratu} = +2300$ mV, $v = 100$ mV/s; B – závislost I_p na pH, C – závislost E_p na pH

3.1.2 Závislost voltametrického chování tenoxikamu na rychlosti polarizace

Dalším měřením byl zjišťován vliv rychlosti polarizace na tvar a výšku píku. Z těchto měření lze usuzovat na řídicí děj studované elektrodové reakce. Měření probíhalo v kyselém prostředí (HNO_3 , $c = 0,1 \text{ mol/l}$). Koncentrace TNX byla $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$. Opět byla použita CV v rozsahu potenciálů $E_{\text{poč}} -1000 \text{ mV}$, $E_{\text{obratu}} +2300 \text{ mV}$ a v byla měněna po 50 mV/s v rozsahu $50\text{-}500 \text{ mV/s}$. Na obrázku 12A jsou uvedeny získané voltametrické křivky.



Obrázek 12 A – Cyklické voltamogramy TNX o koncentraci $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ zaznamenané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace, elektrolyt: HNO_3 ($0,1 \text{ mol/l}$), $E_{\text{poč}} = -1000 \text{ mV}$, $E_{\text{obratu}} = +2300 \text{ mV}$, $v = 50\text{-}500 \text{ mV/s}$, B – závislost I_p na v , C – závislost I_p na $v^{1/2}$, D – závislost $\log(I_p)$ na $\log(v)$

Na obrázku je vidět, že s rostoucí rychlostí polarizace docházelo k nárůstu výšky píku a zároveň k posunu směrem k pozitivnějším potenciálům. Tento posun koresponduje s ireverzibilním průběhem reakce. Z vložené závislosti výšky píku na rychlosti polarizace (obrázek 12B) je patrné, že I_p roste celkem lineárně s rostoucí v (rovnice 2), což by svědčilo o

adsorpčně řízené elektrodové reakci. Dále byla vynesena závislost I_p na $v^{1/2}$ zobrazena na obrázku 12C, která může být popsána rovnicí (3) s příslušným korelačním koeficientem. Tato závislost by mohla být rovněž považována za lineární, což vypovídá o významném vlivu difuze. Vzhledem k nejasným výsledkům, resp. pro upřesnění řídicích procesů u probíhající reakce byla vynesena logaritmická závislost $\log(I_p)$ na $\log(v)$, která je zobrazena na obrázku 12D a odpovídá jí rovnice (4). U logaritmických závislostí je určující hodnota směrnice této rovnice. Pokud se hodnota blíží 1, jedná se o reakci řízenou adsorpcí. Když se hodnota směrnice blíží k 0,5 jde o difúzně řízenou reakci, a když k 0, jde o kineticky řízenou reakci. V tomto případě je hodnota směrnice $(0,203 \pm 0,024)$ a pohybuje se tedy mezi hodnotami 0 a 0,5. Pravděpodobně se jedná o složitější elektrodový děj, který je významně ovlivněn jak difúzí, tak kinetikou nějaké předřazené nebo následné chemické reakce.

$$I_p \text{ [nA]} = (1,706 \pm 0,084) (v \text{ [mV/s]}) + (1213 \pm 26), r = 0,981 \quad (2)$$

$$I_p \text{ [nA]} = (50,814 \pm 0,024) (v \text{ [mV/s]})^{1/2} + (875 \pm 66), r = 0,953 \quad (3)$$

$$\log(I_p \text{ [nA]}) = (0,203 \pm 0,024) \log(v \text{ [mV/s]}) + (2,743 \pm 0,057), r = 0,8987 \quad (4)$$

Vzhledem k nejednoznačným výsledkům byl tento experiment zopakován pro jinou koncentraci analytu ($c_{\text{TNX}} = 5,0 \times 10^{-5}$ mol/l). Rychlost polarizace se tentokrát měnila po 25 mV/s v rozsahu 25-500 mV/s. Opět byl pozorován nárůst proudového signálu TNX a jeho posun směrem k pozitivnějším hodnotám potenciálu. Rovnice popisující jednotlivé závislosti (I_p na v (5), I_p na $v^{1/2}$ (6) a $\log(I_p)$ na $\log(v)$ (7)) jsou uvedeny níže. Z hodnoty směrnice logaritmické závislosti $(0,132 \pm 0,010)$ je evidentní významný vliv kinetiky.

$$I_p \text{ [nA]} = (0,554 \pm 0,037) (v \text{ [mV/s]}) + (629 \pm 11), r = 0,9243 \quad (5)$$

$$I_p \text{ [nA]} = (16,15 \pm 0,97) (v \text{ [mV/s]})^{1/2} + (525 \pm 136), r = 0,939 \quad (6)$$

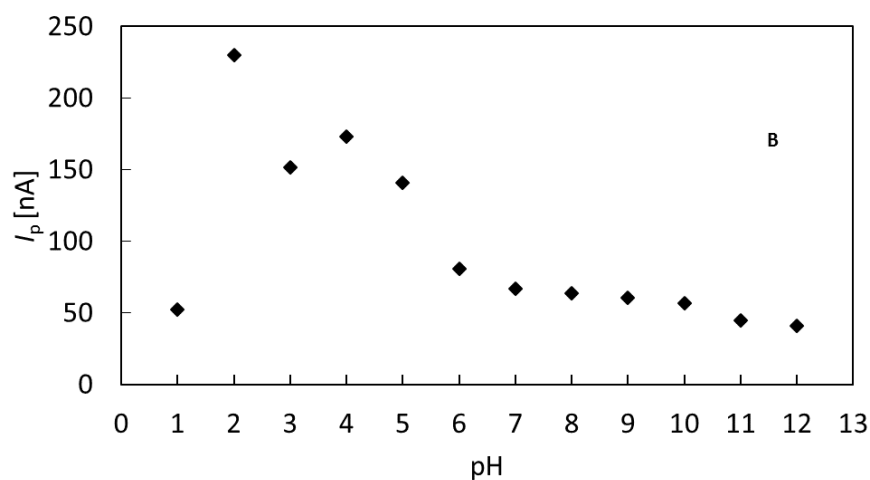
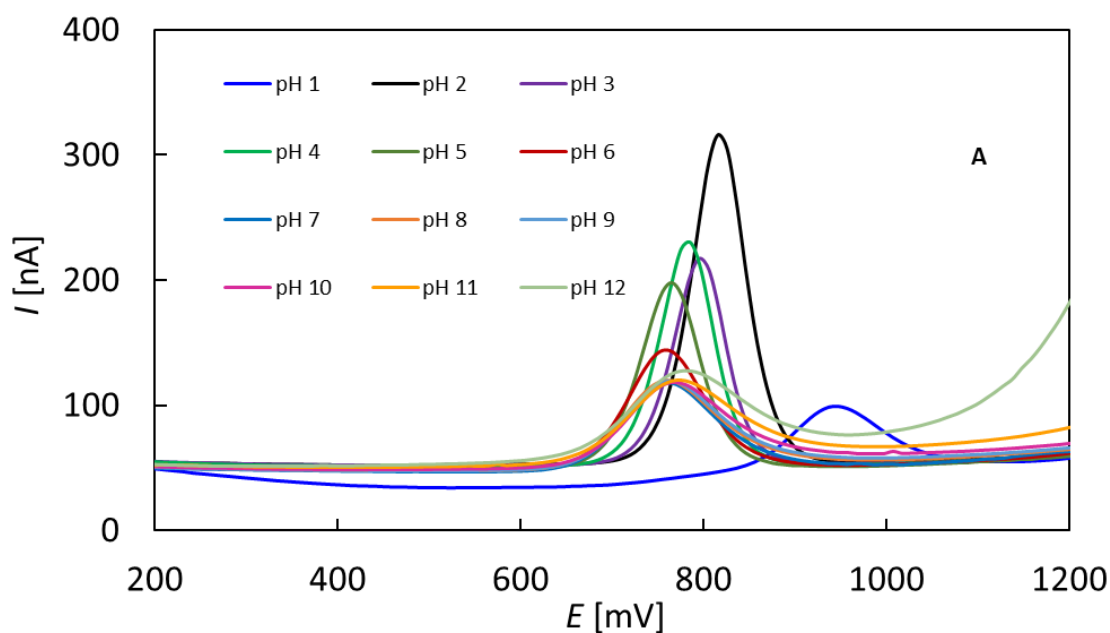
$$\log(I_p \text{ [nA]}) = (0,132 \pm 0,010) \log(v \text{ [mV/s]}) + (2,580 \pm 0,024), r = 0,9056 \quad (7)$$

3.2 Vývoj metody voltametrického stanovení TNX na BDDE

3.2.1 Volba vhodného základního elektrolytu

Vzhledem k velmi dobré citlivosti byly při vývoji metody stanovení TNX testovány DPV a SWV. Prvním krokem byla volba vhodného základního elektrolytu. Při použití CV nebylo zcela zřejmé, jaké pH prostředí umožní získání nejlepšího signálu TNX s ohledem na jeho výšku i tvar. Proto byla studie vlivu pH na sledovaný pík TNX zopakována s využitím DPV.

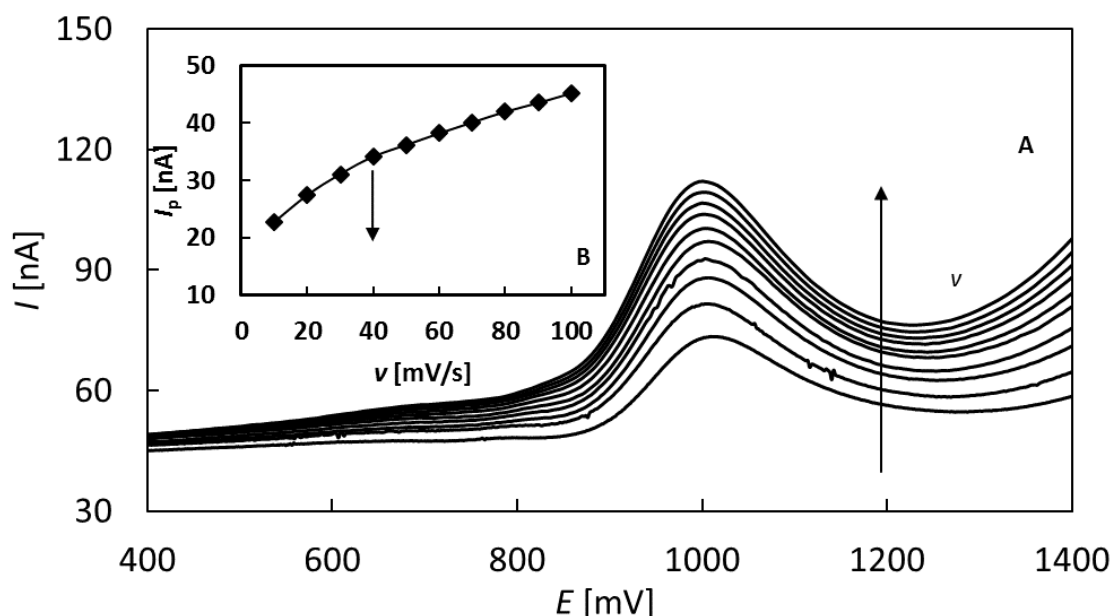
Měření probíhalo opět v prostředí roztoku HNO_3 ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) a BRB o pH 2-12. Parametry DPV byly pro začátek nastaveny následujícím způsobem: $E_{\text{poč}} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{kon}} = +2000 \text{ mV}$, $v = 20 \text{ mV/s}$, výška pulzu = $+50 \text{ mV}$, šířka pulzu = 50 ms . Koncentrace TNX v polarografické nádobce byla $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$. Na obrázku 13A jsou zaznamenány DP voltamogramy TNX. Je vidět že v kyselém prostředí BRB poskytuje tenoxikam vyšší a štíhlejší píky než v zásaditém prostředí. S rostoucí hodnotou pH BRB se výška píku snižuje. Na obrázku 13B je zaznamenána závislost I_p na změně pH, z níž vyplývá, že při pH 2 byl zaznamenán nejvyšší pik. Toto prostředí bylo proto zvoleno pro všechna další měření v rámci této diplomové práce.



Obrázek 13 A – DP voltamogramy TNX o koncentraci $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ zaznamenané na BDDE v závislosti na pH, elektrolyt: HNO_3 ($0,1 \text{ mol/l}$) a BRB (pH 2-12), $E_{\text{poč}} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{kon}} = +2000 \text{ mV}$, $v = 20 \text{ mV/s}$, výška pulzu = $+50 \text{ mV}$, šířka pulzu = 50 ms ; **B** – závislost I_p na pH

3.2.2 Optimalizace parametrů DPV

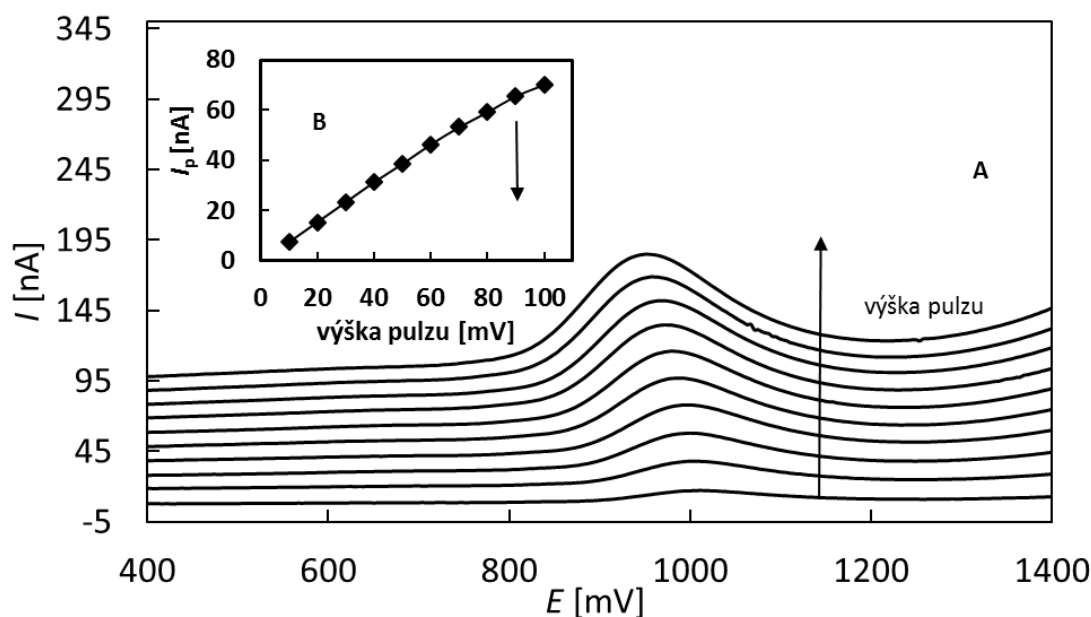
Všechna následující měření probíhala v prostředí BRB o pH 2. Koncentrace TNX při optimalizačních experimentech byla $5,0 \times 10^{-6}$ mol/l. Prvním studovaným parametrem DPV byla rychlost polarizace. Měření probíhalo v rozsahu potenciálů $E_{poč} = 0$ mV a $E_{kon} = +2000$ mV, v se pohybovala v rozmezí 10-100 mV/s, kdy byla měněna po 10 mV/s. Ostatní parametry DPV byly konstantní (šířka pulzu = 50 ms, výška pulzu = +50 mV). Na obrázku 14 jsou zaznamenány DP voltamogramy získané na BDDE spolu s vloženou závislostí I_p na v . Bylo zjištěno, že s rostoucí rychlostí polarizace dochází k růstu proudové odezvy, kdy nárůst byl lineární přibližně do rychlosti 40 mV/s a poté se zpomalil. Současně docházelo k rozšiřování píku a ke zhoršení jeho vyhodnotitelnosti. Pro další měření byla vybrána hodnota rychlosti polarizace 40 mV/s.



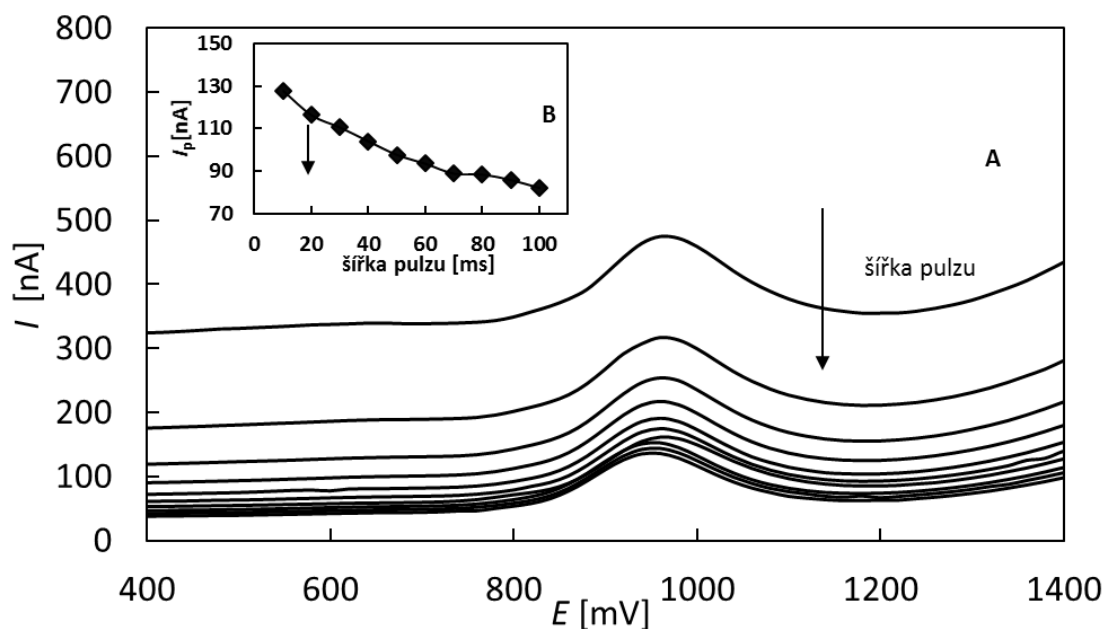
Obrázek 14 A – DP voltamogramy TNX o koncentraci $5,0 \times 10^{-6}$ mol/l zaznamenané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace, elektrolyt: BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 10-100$ mV/s, výška pulzu = +50 mV, šířka pulzu = 50 ms; B – závislost I_p na v

Dalším parametrem, který bylo třeba vhodně nastavit, byla výška pulzu. Ta byla testována v rozsahu od +10 do +100 mV a měněna vždy po 10 mV. Ostatní parametry jsou uvedeny v popisku k obrázku 15, na kterém jsou zobrazeny získané DP voltamogramy opět s vloženou závislostí I_p na výšce pulzu. Z obrázku je zřejmé, že s rostoucí výškou pulzu docházelo ke zvyšování proudové odezvy. Pro další měření byla vybraná hodnota výšky pulzu +90 mV. Posledním testovaným parametrem byla šířka pulzu. Měření probíhalo za stejných podmínek

a šířka byla měněna v rozsahu 10-100 ms (po 10 ms). Na obrázku 16 jsou zobrazeny DP voltamogramy spolu s vloženou závislostí I_p na šířce pulzu. S rostoucí šířkou pulzu dochází k poklesu proudové odezvy. Pro další měření byla nastavena hodnota 20 ms.



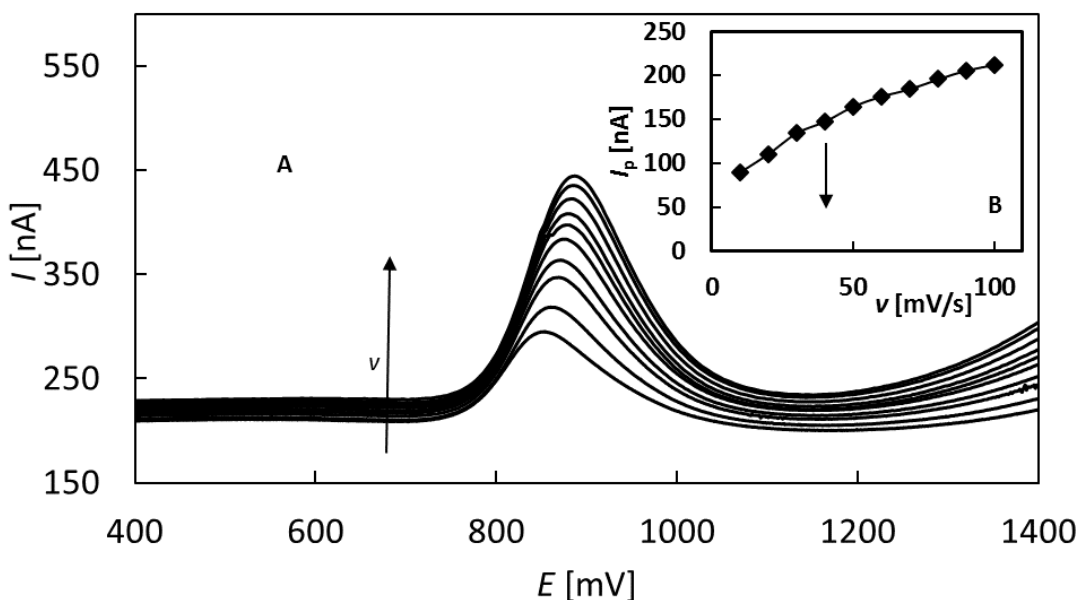
Obrázek 15 A – DP voltamogramy TNX o koncentraci $5,0 \times 10^{-6}$ mol/l zaznamenané na BDDE v závislosti na výšce pulzu, elektrolyt: BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, výška pulzu = +10-+100 mV, šířka pulzu = 50 ms; B – závislost I_p na výšce pulzu



Obrázek 16 A – DP voltamogramy TNX o koncentraci $5,0 \times 10^{-6}$ mol/l zaznamenané na BDDE v závislosti na šířce pulzu, elektrolyt: BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, výška pulzu = +90 mV, šířka pulzu = 10-100 ms; B – závislost I_p na šířce pulzu

3.2.3 Optimalizace parametrů SWV

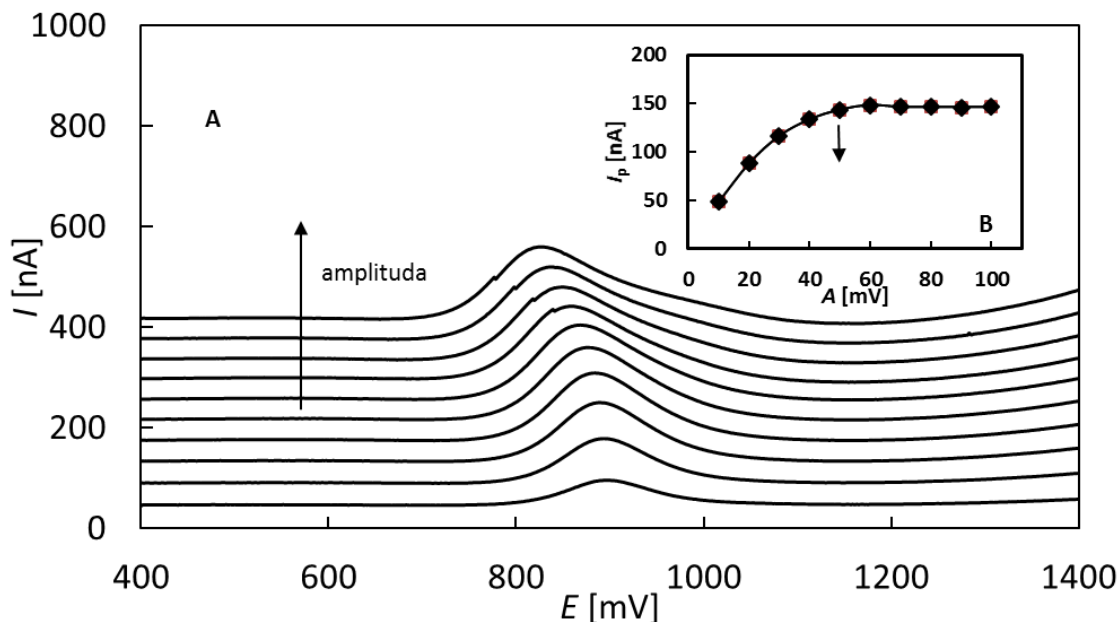
Pro stanovení TNX byla kromě DPV testována i SWV, která je často citlivější. Bylo proto nutné optimalizovat rovněž parametry této metody. Stejně jako v případě DPV byla koncentrace TNX pro tyto experimenty $5,0 \times 10^{-6}$ mol/l a měření probíhala v prostředí BRB o pH 2. Prvním optimalizovaným parametrem byla opět rychlost polarizace, resp. potenciálový krok. Měření probíhalo v rozsahu potenciálů 0 mV až +2000 mV, při výšce pulzu (amplitudě, A) +50 mV a frekvenci pulzu (f) 25 Hz. Rychlost polarizace byla měřena v rozsahu 10-100 mV/s (potenciálový krok 0,4-4 mV) po 10 mV/s. Na obrázku 17 jsou zobrazeny SW voltamogramy s vloženou závislostí I_p na rychlosti polarizace. Ze záznamu je patrné, že s rostoucí rychlostí polarizace docházelo k výraznějšímu nárůstu proudové odezvy do hodnoty 50 mV/s. Pro následující měření byla použita hodnota 40 mV/s (potenciálový krok 1,3 mV).



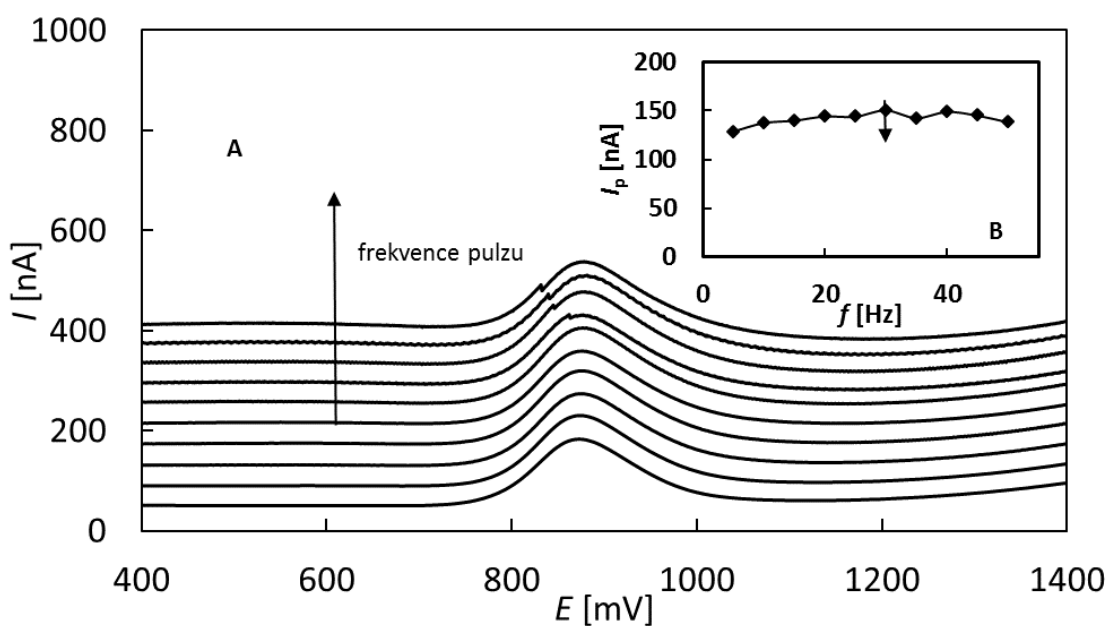
Obrázek 17 A – SW voltamogramy TNX o koncentraci $5,0 \times 10^{-6}$ mol/l zaznamenané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace, elektrolyt: BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 10$ -100 mV/s, $A = +50$ mV, $f = 25$ Hz, B – závislost I_p na v

Druhým parametrem SWV, který byl optimalizován, byla výška pulzu, resp. amplituda. Ta byla měněna v rozsahu +10 až +100 mV vždy po 10 mV. Ostatní parametry jsou specifikovány u obrázku 18, na kterém jsou zobrazeny získané SW voltamogramy s vloženou závislostí I_p na A . S narůstající hodnotou A rostla I_p až do +50 mV. Dále se již výška píku neměnila, ale docházelo k jeho rozšiřování. Pro další měření bylo nastaveno +50 mV. Frekvence byla testována v rozsahu 5-50 Hz, měněna byla po 5 Hz. Naměřené SW

voltamogramy jsou zobrazeny na obrázku 19A. Závislost I_p na f je uvedena na obrázku 19B. Je vidět že frekvence nemá příliš velký vliv na I_p . Nejvyšší proudová odezva byla pozorována kolem středních hodnot z testovaného rozsahu. Pro další měření byla vybrána hodnota f 30 Hz.



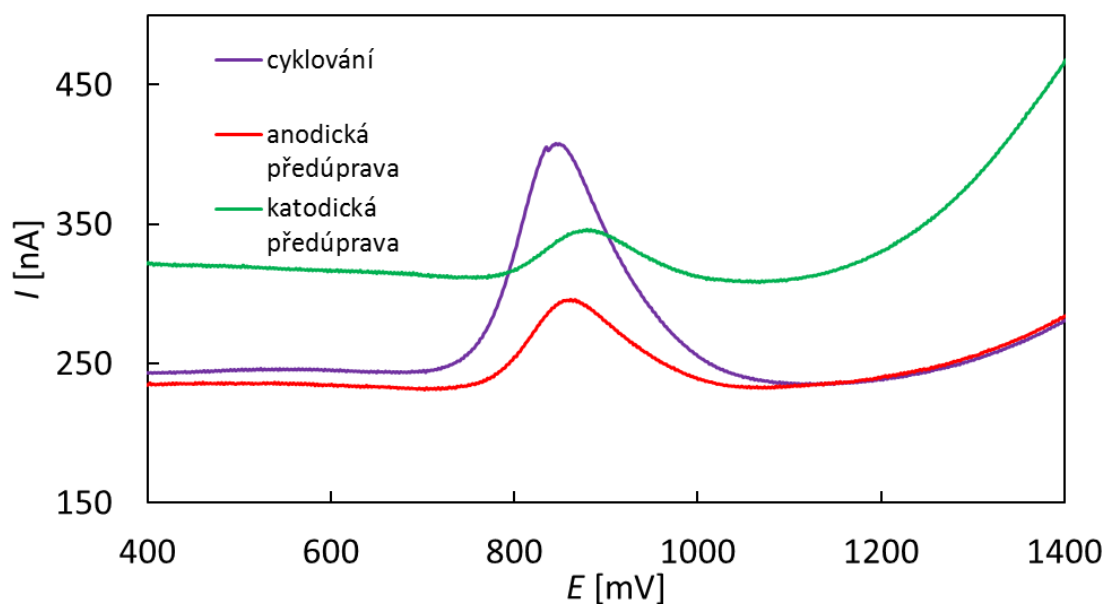
Obrázek 18 A – SW voltamogramy TNX o koncentraci $5,0 \times 10^{-6}$ mol/l zaznamenané na BDDE v závislosti na výšce pulzu, elektrolyt: BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, $A = +10$ - $+100$ mV, $f = 25$ Hz;
B – závislost I_p na A



Obrázek 19 A – SW voltamogramy TNX o koncentraci $5,0 \times 10^{-6}$ mol/l zaznamenané na BDDE v závislosti na frekvenci pulzu, elektrolyt: BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, $A = +50$ mV, $f = 5$ - 50 Hz,
B – závislost I_p na f

3.2.4 Předúprava BDDE

Jak již bylo uvedeno v teoretické části, elektrochemické chování BDDE může být významně ovlivněno procesem předúpravy (pretreatment) jejího povrchu (Baluchova, 2019). Proto byly i v této práci testovány různé postupy předúpravy a jejich vliv na anodický signál TNX. Vždy byl nejprve zařazen konkrétní pretreatment a poté byl změřen pík TNX o koncentraci $5,0 \times 10^{-6}$ mol/l v prostředí BRB o pH 2. Použita byla metoda SWV s optimalizovanými parametry ($E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, $A = +50$ mV, $f = 30$ Hz). Testovány byly 3 různé procedury. Pro anodickou předúpravu byl na elektrodu vložen potenciál +2000 mV po dobu 300 s a výsledkem byl O-terminovaný povrch BDDE. Katodická předúprava byla zajištěna vložením potenciálu -1000 mV po dobu 300 s. Po tomto kroku byl povrch elektrody H-terminovaný. Posledním testovaným postupem bylo vložení 20 cyklických voltamogramů v rozsahu potenciálů -1000 až +2000 mV, při rychlosti polarizace 100 mV/s. Všechny uvedené postupy byly realizovány přímo v roztoku používaného základního elektrolytu (BRB o pH 2). Získané SW voltamogramy jsou zaznamenány na obrázku 20. Je zřejmé, že nejvyšší pík byl pozorován po zařazení cyklování. Naopak anodický i katodický pretreatment vedl ke snížení proudové odezvy TNX. Navíc při zařazení negativního potenciálu došlo ke zvýšení proudu pozadí.



Obrázek 20 SW voltamogramy TNX o koncentraci $5,0 \times 10^{-6}$ mol/l zaznamenané na BDDE v závislosti na procesu úpravy pracovní elektrody, elektrolyt: BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, $A = +50$ mV, $f = 30$ Hz, katodická předúprava: -1000 mV, 300 s, anodická předúprava: +2000 mV, 300 s, cyklování: 20 cyklů (-1000-+2000 mV, 100 mV/s)

3.2.5 Analýza modelových roztoků tenoxikamu s využitím BDDE

Po optimalizaci podmínek byla proměřena řada koncentračních závislostí pro TNX v modelových roztocích s využitím DPV i SWV. Na obrázcích 21 (DPV) a 22 (SWV) jsou uvedeny příklady voltamogramů zaznamenaných na BDDE s využitím obou testovaných metod včetně vložených závislostí I_p na c_{TNX} . Konkrétní podmínky měření jsou shrnuty v popiscích k obrázkům. Rozsah koncentrací TNX, v němž při zvyšování koncentrace docházelo k lineárnímu nárůstu výšky píku byl pro obě metody stejný, a to $5,0 \times 10^{-7}$ – $1,5 \times 10^{-5}$ mol/l ($r = 0,9990$ (DPV), $0,9995$ (SWV)). Z uvedených koncentračních závislostí byly vypočteny základní statistické parametry, které jsou shrnuty v tabulce 1.

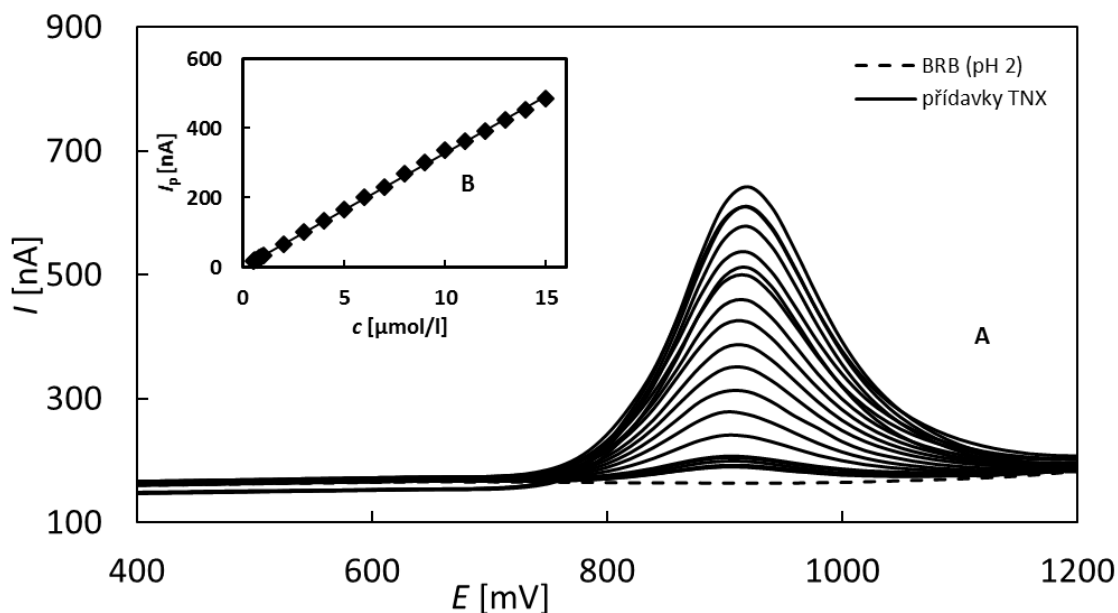
Tabulka 1 Statistické parametry vypočtené pro TNX z koncentračních závislostí změřených metodami DPV a SWV se spojení s BDDE

	Směrnice	Úsek	r	LDR	LOD	LOQ
	[nA l/ μ mol]	[nA]		[mol/l]	[mol/l]	[mol/l]
DPV	(32,65 \pm 0,19)	(1,9 \pm 1,4)	0,9990	$4,0 \times 10^{-7}$ – $1,5 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-7}$	$4,5 \times 10^{-7}$
SWV	(34,68 \pm 0,13)	(2,1 \pm 1,0)	0,9995	$2,0 \times 10^{-7}$ – $1,5 \times 10^{-5}$	$9,8 \times 10^{-8}$	$2,9 \times 10^{-7}$

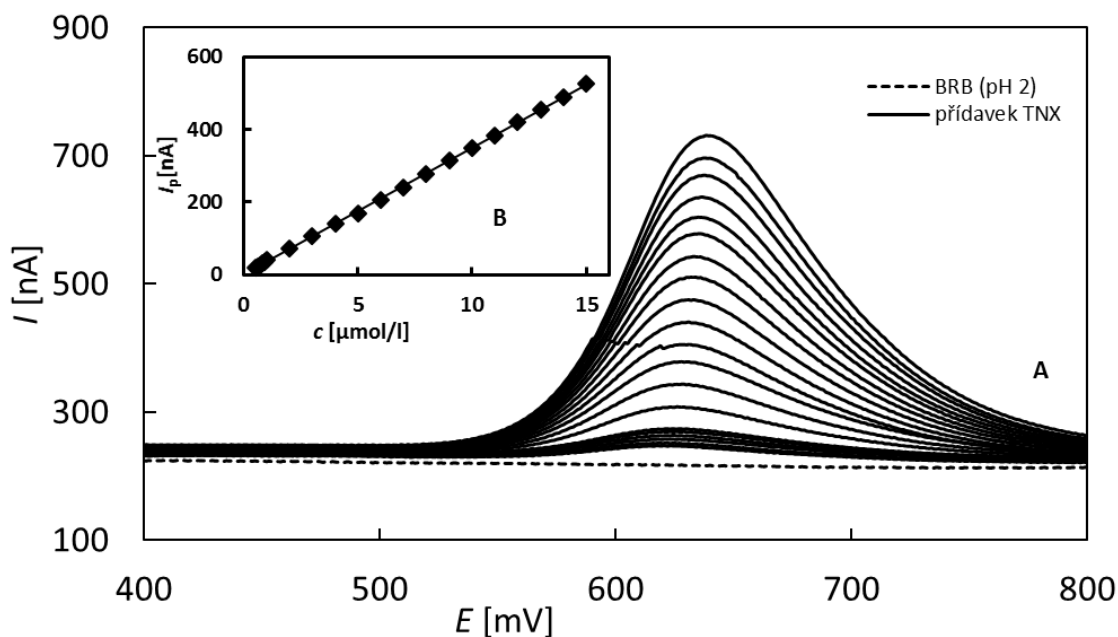
DPV – diferenční pulzní voltametrie, LDR – lineární dynamický rozsah, LOD – limit detekce, LOQ – mez stanovitelnosti. r – korelační koeficient, SWV – square wave voltametrie

Z uvedené tabulky vyplývá, že obě testované metody poskytují velice podobné výsledky včetně výšky proudového píku při stejné koncentraci TNX v roztoku. Přesto o něco lepší statistické parametry byly dosaženy s využitím SWV. Konkrétně hodnota směrnice koncentrační závislosti, resp. citlivost měření je o něco vyšší (34,68 \pm 0,13), jak je vidět z obrázku 23. Rovněž vypočtený detekční limit je pro SWV nižší. Využitelný koncentrační rozsah, tj. lineární dynamický rozsah je pro obě metody také téměř stejný.

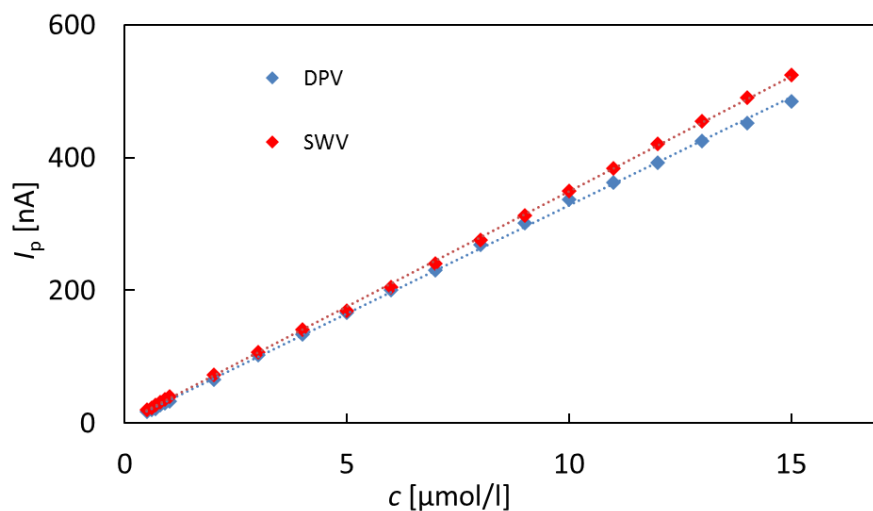
Vzhledem k dosaženým výsledkům byla pro stanovení TNX v rámci této diplomové práce nadále používána jako vhodnější metoda SWV.



Obrázek 21 A – DP voltamogramy TNX zaznamenané na BDDE v závislosti na koncentraci, elektrolyt: BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, šířka pulzu = +20 ms, výška pulzu = +90 mV, $c_{TNX} = 5,0 \times 10^{-7}$ – $1,5 \times 10^{-5}$ mol/l, B – závislost I_p na c_{TNX}

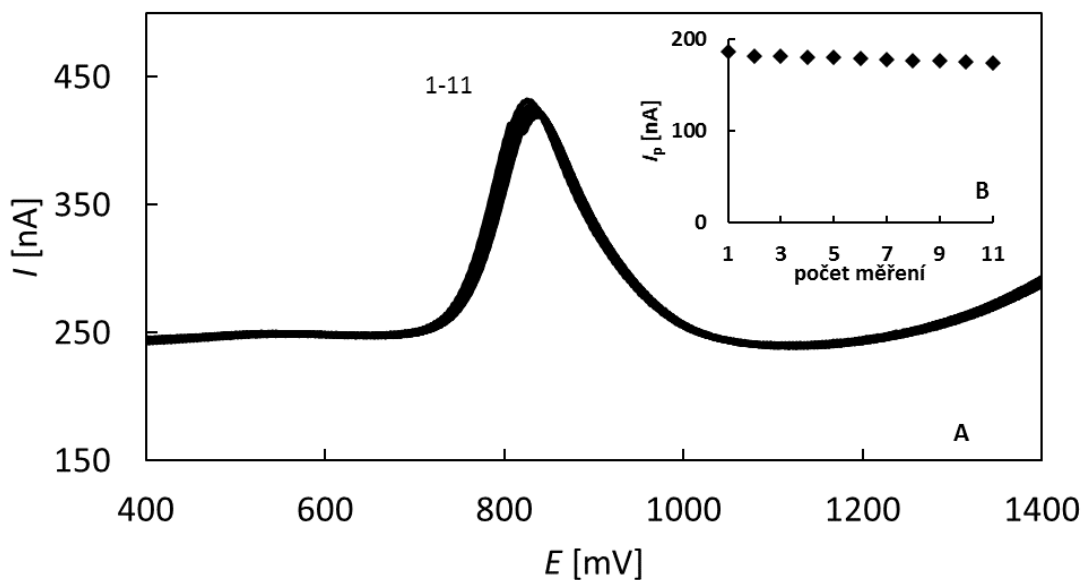


Obrázek 22 A – SW voltamogramy TNX zaznamenané na BDDE v závislosti na koncentraci, elektrolyt: BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, $A = +50$ mV, $f = 30$ Hz, $c_{TNX} = 5,0 \times 10^{-7}$ – $1,5 \times 10^{-5}$ mol/l, B – závislost I_p na c



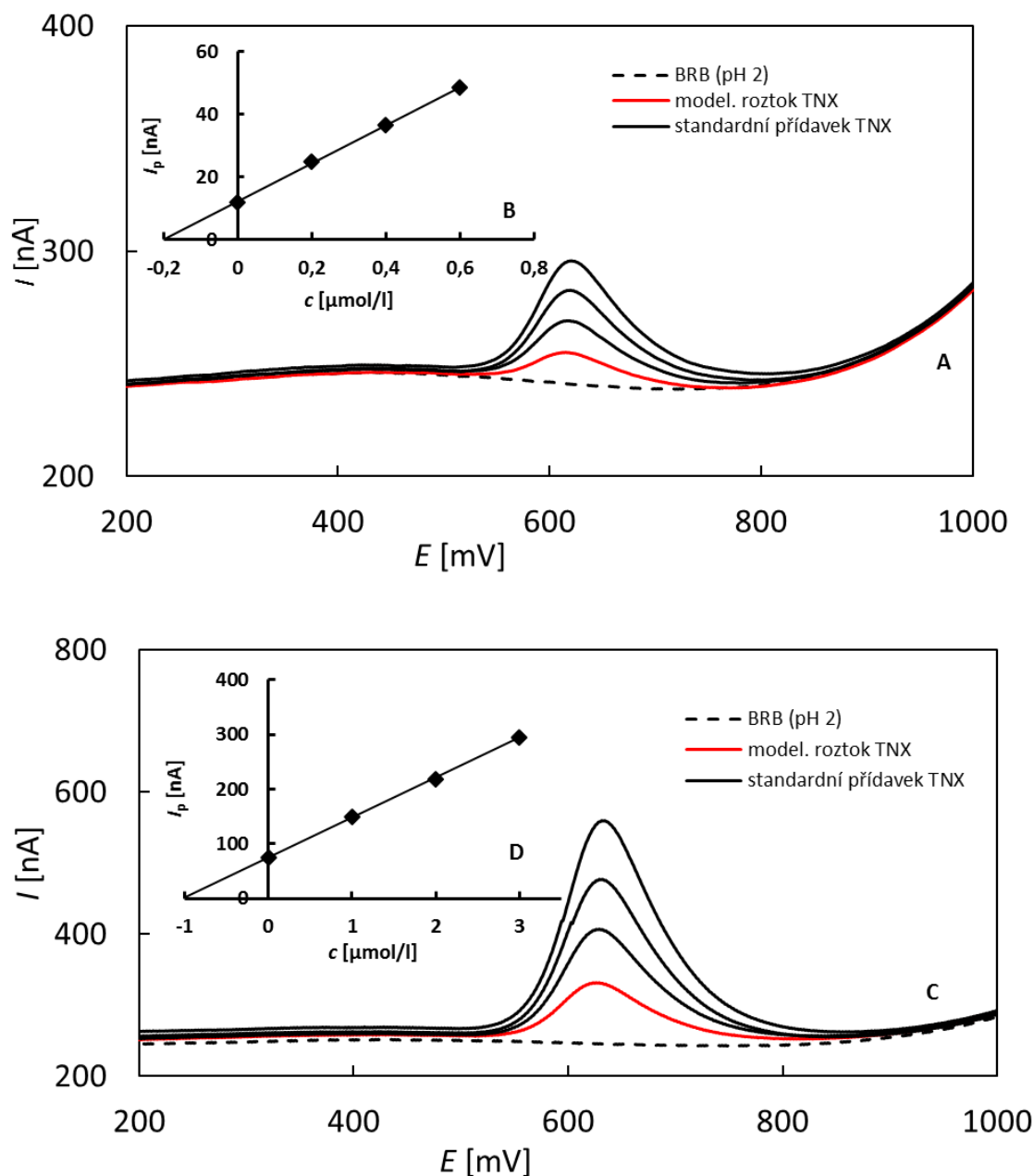
Obrázek 23 Koncentrační závislosti TNX ($5,0 \times 10^{-7}$ – $1,5 \times 10^{-5}$ mol/l) měřené metodou DPV a SWV (podmínky měření jsou uvedeny u obrázků 21 a 22)

Další experiment v této kapitole byl zaměřen na ověření opakovatelnosti měření s využitím SWV s optimalizovanými parametry. V roztoku TNX o koncentraci $5,0 \times 10^{-6}$ mol/l v prostředí BRB o pH 2 bylo změřeno celkem 11 opakovaných voltametrických křivek, které jsou zobrazeny na obrázku 24. Z obrázku i vložené závislosti je vidět, že při opakování měření nedocházelo ke změně tvaru ani výšky proudového signálu TNX. Vypočítaná relativní směrodatná odchylka ($RSD_{11} = 1,96 \%$) svědčí o velmi dobré opakovatelnosti měření. Mezi jednotlivá měření nebylo nutné vkládat žádný regenerační, resp. aktivační krok.



Obrázek 24 A – SW voltamogramy 11 opakovaných měření TNX o koncentraci $5,0 \times 10^{-6}$ mol/l zaznamenané na BDDE, elektrolyt: BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, $A = 50$ mV, $f = 30$ Hz, B – závislost I_p na počtu měření

Vyvinutá metoda byla dále testována při opakovaném stanovení obsahu TNX v modelových roztocích. Byly zvoleny 2 různé koncentrace analytu $2,0 \times 10^{-7}$ mol/l a $1,0 \times 10^{-6}$ mol/l. Pro analýzu byla použita metoda přidavku standardního roztoku (SAM, standard addition method), kdy byly ke vzorku do polarografické nádoby přidány vždy 3 přidavky roztoku TNX o koncentraci $1,0 \times 10^{-3}$ mol/l. Stanovení bylo $5 \times$ zopakováno pro každou koncentraci. Na obrázku 25 jsou uvedeny příklady SW voltamogramů získaných při analýze obou modelových roztoků s vloženým grafickým vyhodnocením SAM.



Obrázek 25 A, C – Analýza modelového roztoku TNX o koncentraci $2,0 \times 10^{-7}$ mol/l (A) a $1,0 \times 10^{-6}$ mol/l (C) metodou standardního přidavku s využitím SWV ve spojení s BDDE, elektrolyt: BRB o pH 2, $E_{\text{poč}} = 0$ mV, $E_{\text{kon}} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, $A = +50$ mV, $f = 30$ Hz, modelový roztok: $V = 10$ ml, standardní přidavek: $V = 2$ μl (A) a 10 μl (C), $c_{\text{TNX}} = 1,0 \times 10^{-3}$ mol/l; B, D – grafické vyhodnocení SAM

Na základě popsaných měření byla vždy vypočítána průměrná koncentrace TNX v modelovém roztoku s příslušným intervalem spolehlivosti, výtěžnost a relativní směrodatná odchylka 5 opakovaných stanovení (RSD_5). Výsledky pro oba analyzované roztoky jsou shrnuty v tabulce 2. Je zřejmé, že byly stanoveny správné koncentrace TNX. Z hodnot RSD_5 ($< 2\%$) vyplývá, že stanovení bylo velmi dobře opakovatelné.

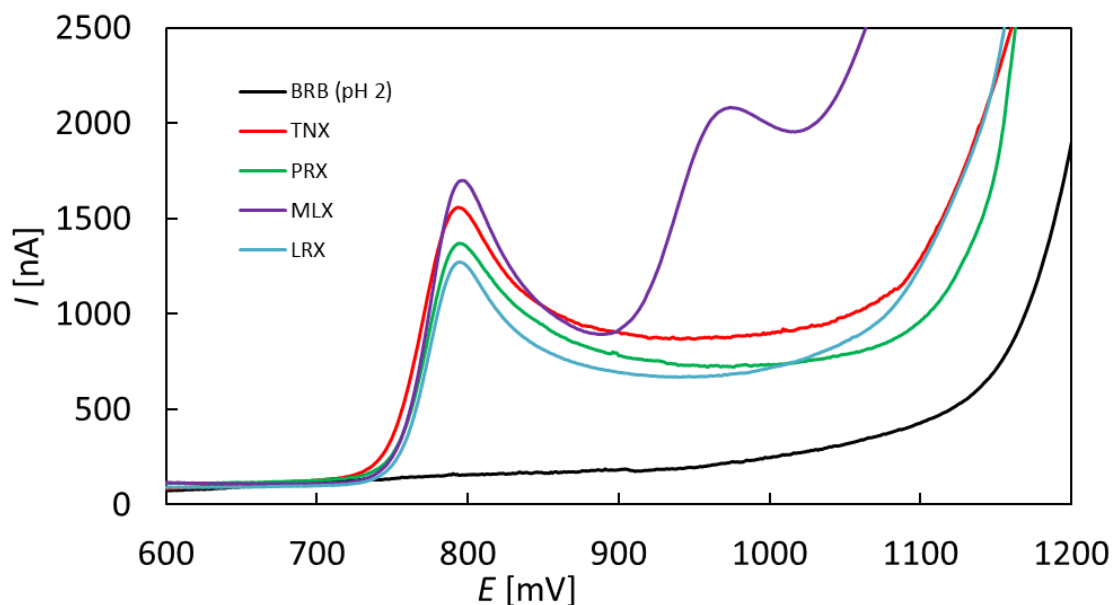
Tabulka 2 Výsledky opakovaného stanovení TNX v modelových roztocích s využitím SWV ve spojení s BDDE a metody standardního přídavku

c [mol/l]	Stanoveno [mol/l]	Výtěžnost [%]	RSD_5 [%]
$2,0 \times 10^{-7}$	$(0,1955 \pm 0,0054) \times 10^{-6}$	96,9-101,9	1,9
$1,0 \times 10^{-6}$	$(1,006 \pm 0,014) \times 10^{-6}$	98,3-102,7	1,4

3.2.6 Analýza modelových roztoků dalších léčiv ze skupiny oxikamů

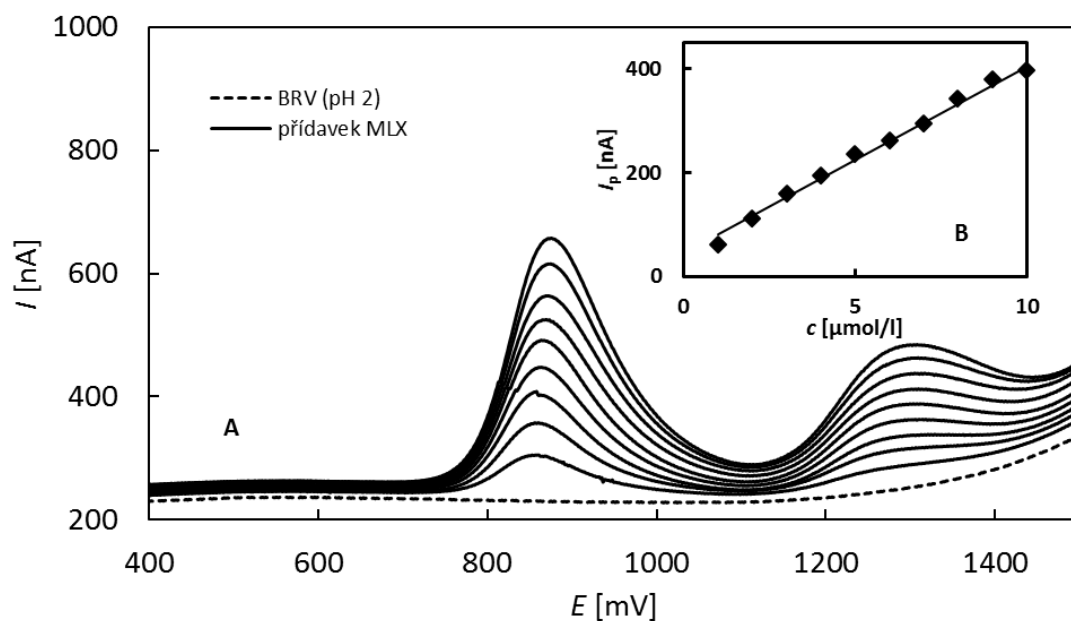
Vzhledem k tomu, že v České republice nejsou na rozdíl od jiných zemí dostupné farmaceutické přípravky s TNX jako účinnou látkou, nebylo možné v rámci této diplomové práce aplikovat vyvinutou metodu při analýze reálného vzorku léčiva. Proto byla pozornost zaměřena na další látky ze skupiny oxikamových léčiv (meloxicam (MLX), piroxicam (PRX) a lornoxicam (LRX)), jejichž lékové formy dostupné jsou. Jak již bylo zmíněno v teoretické části, měly by všechny tyto látky poskytovat stejný anodický pík odpovídající oxidaci hydroxylové skupiny (Šelešovská, 2019). Následující kapitola je proto věnována aplikaci metody vyvinuté pro stanovení TNX při analýze modelových roztoků dalších oxikamových léčiv. Cílem je ověřit možnost využití této metody při analýze komerčně dostupných farmaceutických přípravků s obsahem těchto účinných látek, a tedy i s obsahem TNX.

Na obrázku 26 jsou zobrazeny anodické části cyklických voltamogramů studovaných oxikamů při koncentraci $5,0 \times 10^{-5}$ mol/l v polarografické nádobce v prostředí BRB o pH 2. Parametry CV jsou uvedeny u obrázku. Z obrázku vyplývá, že všechny analyzované oxikamy poskytují 1 anodický signál okolo potenciálu +800 mV stejně jako TNX. MLX navíc poskytuje ještě druhý pík při potenciálu okolo +980 mV, který odpovídá oxidaci amidové funkční skupiny. Tyto výsledky jsou v souladu s literaturou (Bozal, 2010, Šelešovská, 2019).

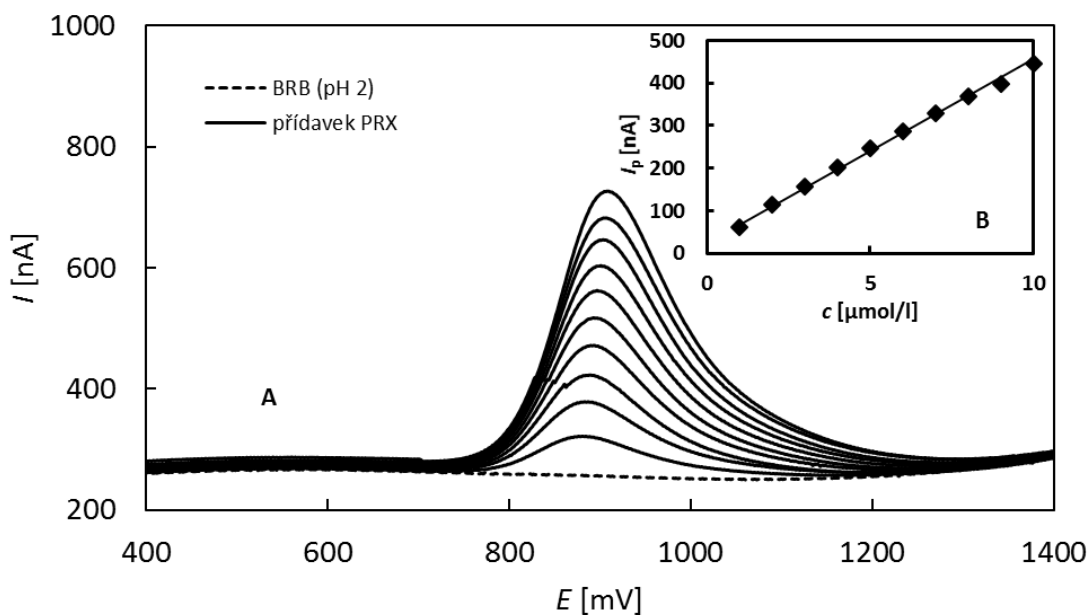


Obrázek 26 Anodické části cyklických voltamogramů studovaných oxikamů o koncentraci $5,0 \times 10^{-5}$ mol/l, elektrolyt: BRB o pH 2, $E_{poč} = -1000$ mV, $E_{obratu} = +2300$ mV, $v = 100$ mV/s

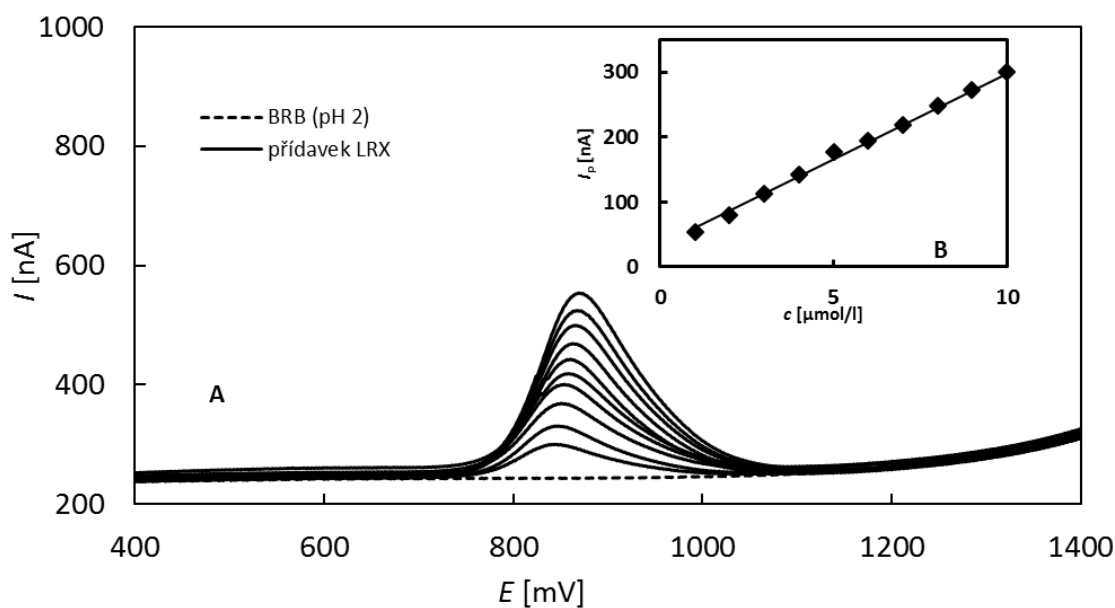
Pro všechny 3 další studované oxikamy byly změřeny koncentrační závislosti v rozsahu koncentrací $1,0 \times 10^{-6}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ mol/l s využitím metody SWV v kombinaci s BDDE při nastavených optimalizovaných podmínkách. Tyto závislosti pro jednotlivé oxikamy jsou uvedeny na obrázcích 27 (MLX), 28 (PRX) a 29 (LRX). Měření probíhalo v prostředí BRB o pH 2, v rozsahu potenciálů od 0 do +2000 mV, při $v = 40$ mV/s, $A = 50$ mV a $f = 30$ Hz. Z vložených závislostí I_p na c vyplývá, že výška píků roste lineárně s koncentrací analytů.



Obrázek 27 A – SW voltamogramy MLX zaznamenané na BDDE v závislosti na c_{MLX} , BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, $A = +50$ mV, $f = 30$ Hz, $c_{MLX} = 1,0 \times 10^{-6}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ mol/l, B – závislost I_p na c



Obrázek 28 A – SW voltamogramy PRX zaznamenané na BDDE v závislosti na c_{PRX} , BRB o pH 2, $E_{\text{poč}} = 0$ mV, $E_{\text{kon}} = +2000$ mV, $\nu = 40$ mV/s, $A = +50$ mV, $f = 30$ Hz, $c_{\text{PRX}} = 1,0 \times 10^{-6}$ – $1,0 \times 10^{-5}$ mol/l, B – závislost I_p na c



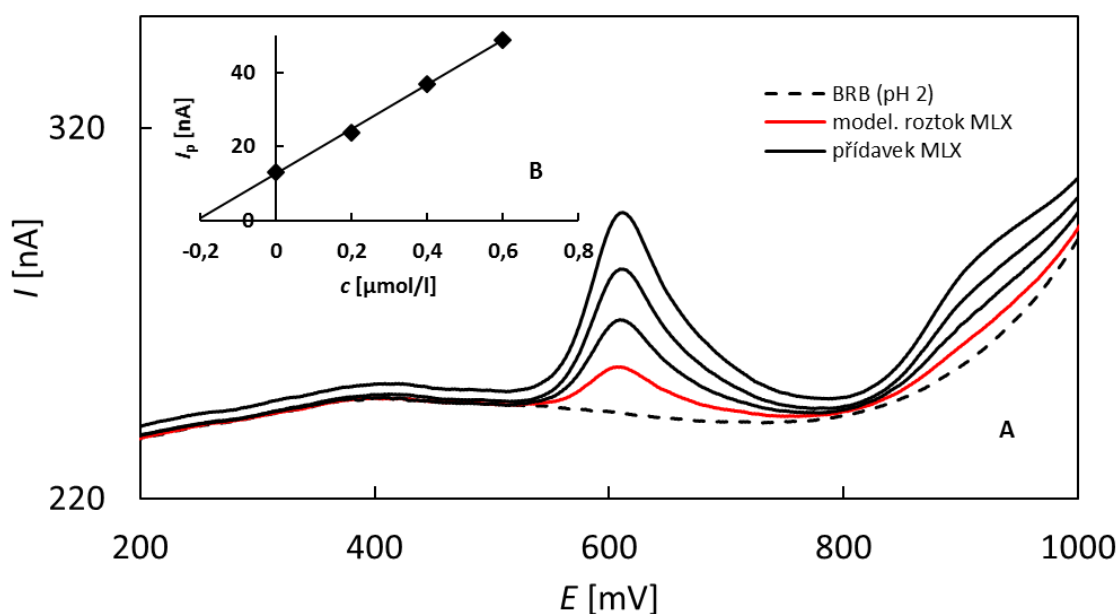
Obrázek 29 A – SW voltamogramy LRX zaznamenané na BDDE v závislosti na c_{LRX} , BRB o pH 2, $E_{\text{poč}} = 0$ mV, $E_{\text{kon}} = +2000$ mV, $\nu = 40$ mV/s, $A = +50$ mV, $f = 30$ Hz, $c_{\text{LRX}} = 1,0 \times 10^{-6}$ – $1,0 \times 10^{-5}$ mol/l, B – závislost I_p na c

Stejně jako v případě TNX bylo provedeno opakované stanovení obsahu MLX, PRX a LRX v modelových roztocích metodou standardního přídávku. Pro tyto oxikamy byla stanovována pouze jedna koncentrace, a to $2,0 \times 10^{-7}$ mol/l. Stanovení každého léčiva bylo opět $5 \times$ zopakováno a z výsledků byla vypočítána průměrná koncentrace s příslušným

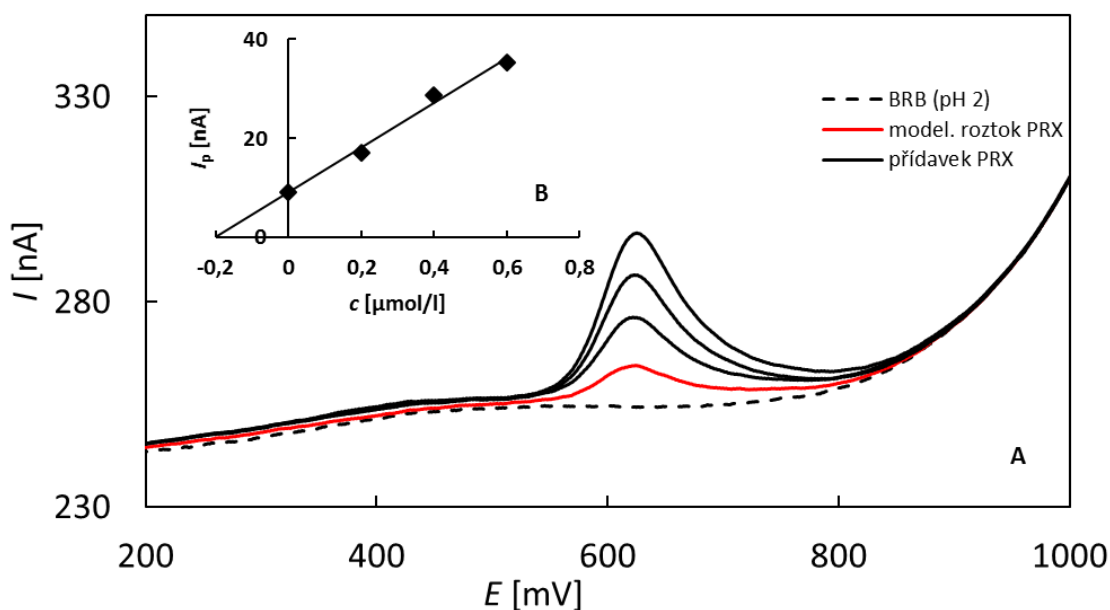
intervalem spolehlivosti, výtěžnost a RSD_5 . Hodnoty pro všechny analyty jsou uvedeny v tabulce 3. Získané SW voltamogramy s grafickým vyhodnocením SAM jsou zobrazeny na obrázku 30 pro MLX, 31 pro PRX a 32 pro LRX. Z tabulky vyplývá, že ve všech případech byly s využitím SWV s BDDE stanoveny správné koncentrace, a že stanovení bylo velmi dobře opakovatelné ($RSD_5 < 3 \%$). Na závěr této kapitoly je tedy možné shrnout, že byla vyvinuta metoda pro stanovení TNX, která je současně vhodná i pro stanovení dalších léčiv ze skupiny oxikamů, konkrétně MLX, PRX a LRX.

Tabulka 3 Výsledky opakovaného stanovení MLX, PRX a TNX v modelových roztocích s využitím SWV ve spojení s BDDE a metody standardního přídávku

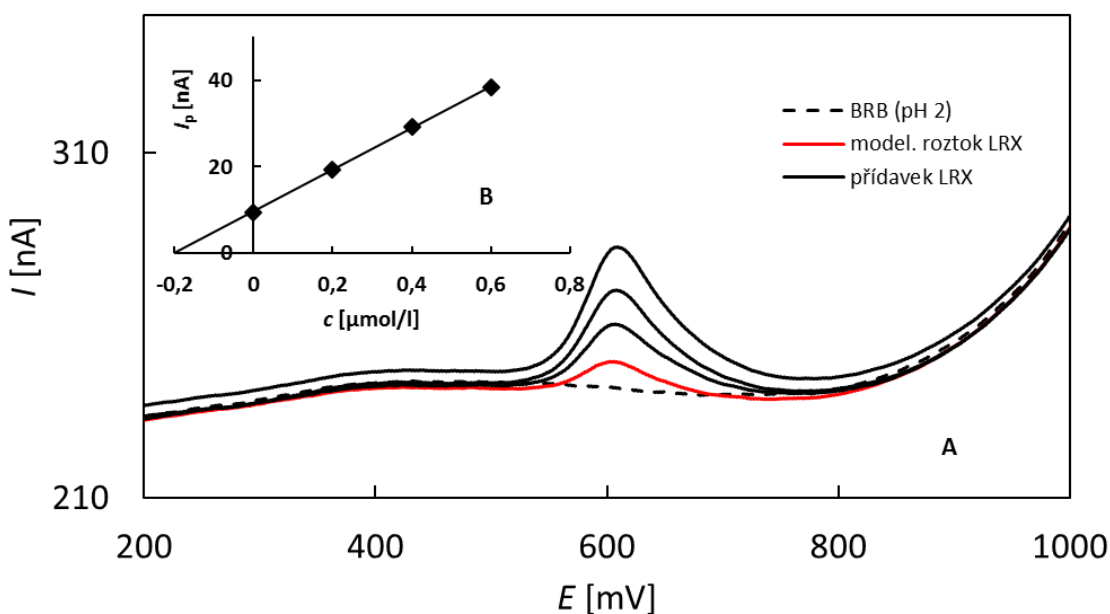
	c [mol/l]	Stanoveno [mol/l]	Výtěžnost [%]	RSD_5 [%]
PRX	$2,0 \times 10^{-7}$	$(2,0029 \pm 0,0020) \times 10^{-7}$	98,7-101,6	1,0
LRX	$2,0 \times 10^{-7}$	$(1,9955 \pm 0,0042) \times 10^{-7}$	97,5-103,4	2,1
MLX	$2,0 \times 10^{-7}$	$(2,0038 \pm 0,0040) \times 10^{-7}$	96,9-102,7	2,5



Obrázek 30 A – Analýza modelového roztoku MLX o koncentraci $2,0 \times 10^{-7}$ mol/l metodou standardního přídávku s využitím SWV ve spojení s BDDE, BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, $A = +50$ mV, $f = 30$ Hz, modelový roztok: $V = 10$ ml, standardní přídavek: $V = 2$ μ l, $c_{MLX} = 1,0 \times 10^{-3}$ mol/l, B – závislost I_p na c



Obrázek 31 A – Analýza modelového roztoku PRX o koncentraci $2,0 \times 10^{-7}$ mol/l metodou standardního přídávku s využitím SWV ve spojení s BDDE, BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, $A = +50$ mV, $f = 30$ Hz, modelový roztok: $V = 10$ ml, standardní přídavek: $V = 2$ μ l, $c_{PRX} = 1,0 \times 10^{-3}$ mol/l, B – závislost I_p na c



Obrázek 32 A – Analýza modelového roztoku LRX o koncentraci $2,0 \times 10^{-7}$ mol/l metodou standardního přídávku s využitím SWV ve spojení s BDDE, BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, $A = +50$ mV, $f = 30$ Hz, modelový roztok: $V = 10$ ml, standardní přídavek: $V = 2$ μ l, $c_{LRX} = 1,0 \times 10^{-3}$ mol/l, B – závislost I_p na c

3.3 Analýza farmaceutických přípravků s využitím SWV ve spojení s BDDE

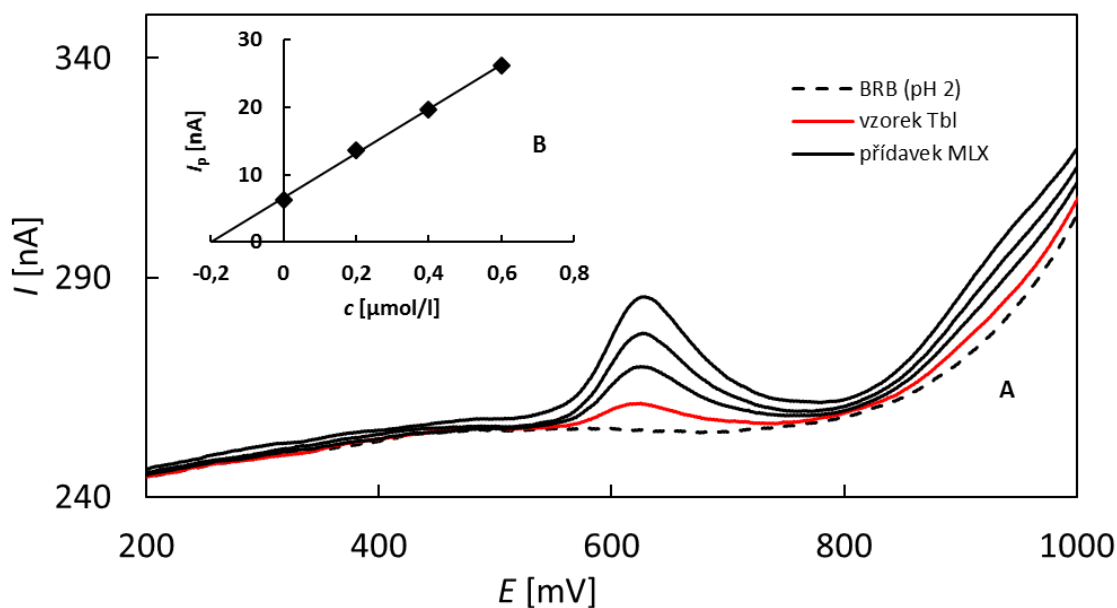
Tato kapitola je věnována analýze farmaceutických přípravků. Jde tedy o aplikaci vyvinuté metody při analýze praktických vzorků. Jak již bylo uvedeno výše, v České republice není dostupný žádný lék obsahující jako účinnou látku tenoxicam. Proto byla analyzována léčiva obsahující jiné látky ze skupiny oxikamů, konkrétně MLX, PRX a LRX. Využitelnost nové metody i pro stanovení těchto látek byla ověřena v předchozí kapitole. Konkrétně byly analyzovány přípravky Xefo rapid s výrobcem deklarovaným obsahem LRX 8 mg na tabletu, Flamexin s obsahem PRX 20 mg na tabletu a Meloxicam Mylan s obsahem MLX 15 mg na tabletu. Příprava roztoků tablet k analýze je popsána v kapitole 2.3.3 Analýza farmaceutických přípravků.

Měření probíhalo v prostředí BRB o pH 2 metodou SWV ve spojení s BDDE za optimalizovaných podmínek, které jsou uvedeny v popisících jednotlivých obrázků. Stanovení obsahu MLX, PRX a LRX ve farmaceutických přípravcích bylo provedeno metodou přidavku standardního roztoku. Analýza každého léčiva byla vždy 5× zopakována a byl vypočten průměrný obsah účinné látky a další statistické parametry. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 4. Příklady SW voltamogramů konkrétních analýz spolu s grafickým vyhodnocením SAM jsou prezentovány na obrázku 33 pro MLX, 34 pro LRX a 35 pro PRX. Z tabulky vyplývá, že pro všechny analyzované přípravky byly s využitím SWV a BDDE stanoveny koncentrace odpovídající obsahům účinných látek deklarovaným výrobcem. Stanovení bylo velmi dobře opakovatelné, o čemž svědčí hodnota RSD_5 ($< 3,5$ %). Je tedy možné říci, že vyvinutá metoda je vhodná pro stanovení oxikamových léčiv, mezi něž patří i TNX, v praktických vzorcích farmaceutických přípravků.

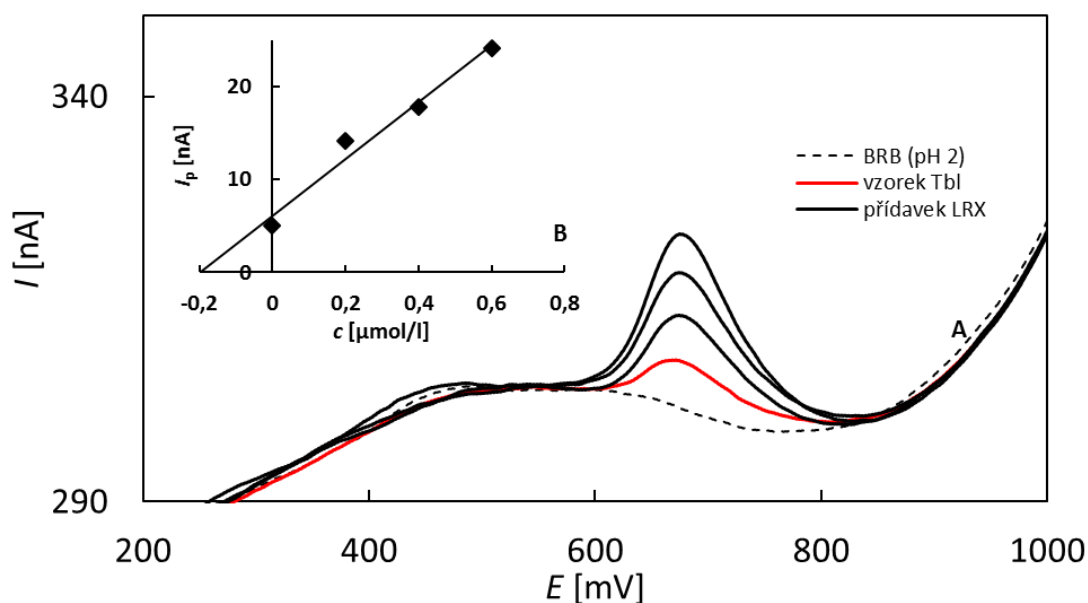
Tabulka 4 Výsledky opakovaného stanovení oxikamů ve farmaceutických přípravcích s využitím SWV ve spojení s BDDE a metody standardního přidavku

	Deklarováno [mg/Tbl.]	Stanoveno [mg/Tbl.]	Výtěžnost* [%]	RSD_5 [%]
PRX	20,0	20,31±0,46	98,2-101,8	1,3
LRX	8,0	8,17±0,19	97,3-102,5	2,1
MLX	15,0	14,99±0,36	96,7-104,9	3,1

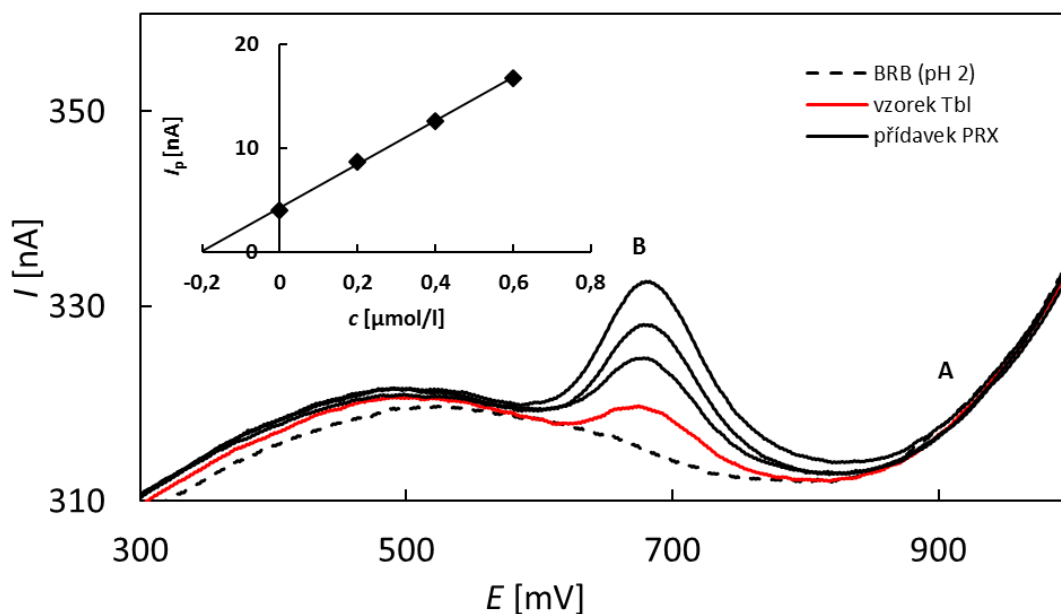
* Výtěžnost byla vypočtena z hodnot obsahů účinných látek v tabletách deklarovaných výrobcem.



Obrázek 33 A – Analýza farmaceutického přípravku Meloxicam Mylan metodou standardního přídavku s využitím SWV ve spojení s BDDE, BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, $A = +50$ mV, $f = 30$ Hz, roztok vzorku: $V = 10$ ml BRB + $4,7$ μ l roztoku Tbl., standardní přídavek: $V = 2$ μ l, $c_{MLX} = 1,0 \times 10^{-3}$ mol/l, B – závislost I_p na c



Obrázek 34 A – Analýza farmaceutického přípravku Xefo rapid metodou standardního přídavku s využitím SWV ve spojení s BDDE, BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, $A = +50$ mV, $f = 30$ Hz, roztok vzorku: $V = 10$ ml BRB + $9,3$ μ l roztoku Tbl., standardní přídavek: $V = 2$ μ l, $c_{LRX} = 1,0 \times 10^{-3}$ mol/l, B – závislost I_p na c



Obrázek 35 A – Analýza farmaceutického přípravku Flamexin metodou standardního přídavku s využitím SWV ve spojení s BDDE, BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, $A = +50$ mV, $f = 30$ Hz, roztok vzorku: $V = 10$ ml BRB + 3,3 μl roztoku Tbl., standardní přídavek: $V = 2$ μl , $c_{PRX} = 1,0 \times 10^{-3}$ mol/l, B – závislost I_p na c

3.4 Předběžné testování tištěných senzorů na bázi BDDE

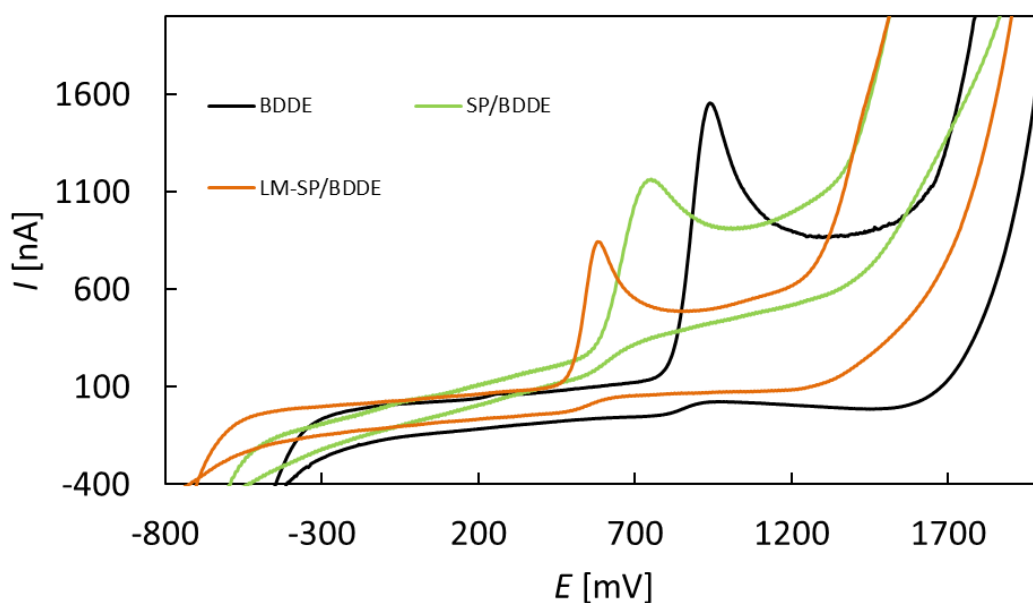
V dnešní době nachází široké uplatnění vedle klasických také tištěné elektrody (SPE – screen-printed electrode), které mají řadu výhod. Jejich hlavní předností je možnost využití jako jednorázových senzorů zejména v oblasti biomedicínských aplikací. Další výhodou je např. možnost použití v průtokových systémech nebo při analýze malých objemů vzorků, kde lze pracovat s kapičkou o objemu v řádu desítek μl . Tyto senzory se vyrábí sítotiskovou technologií, kdy je na povrch nosiče nanesen speciální vodivý inkoust. Obvykle se tiskne celé tříelektrodové uspořádání elektrochemického článku. Pro zlepšení citlivosti může být povrch pracovní elektrody modifikován stejně jako povrch klasických elektrod, např. kovovými a uhlíkovými nanočásticemi, enzymy nebo protilátkami. Takto modifikované elektrody slouží jako biosenzory, které lze uplatit v medicíně, farmacii nebo v analýze potravin a životního prostředí (Dědík, 2011, Kondo, 2011).

Tato kapitola je věnována testování tištěných elektrod na bázi borem dopovaného diamantu v porovnání s klasickou BDDE. Použity byly 2 varianty SPE, konkrétně komerčně dostupná SP/BDDE of firmy DropSens a laboratorně vyrobená (LM) SP/BDDE (STU,

Bratislava). Jejich základní vlastnosti jsou uvedeny v experimentální části této práce. Vzhledem k tomu, že všechny 3 používané BDD elektrody mají rozdílnou elektroaktivní plochu, byly některé z výsledků přepočteny z proudu na proudovou hustotu, aby byly vzájemně porovnatelné.

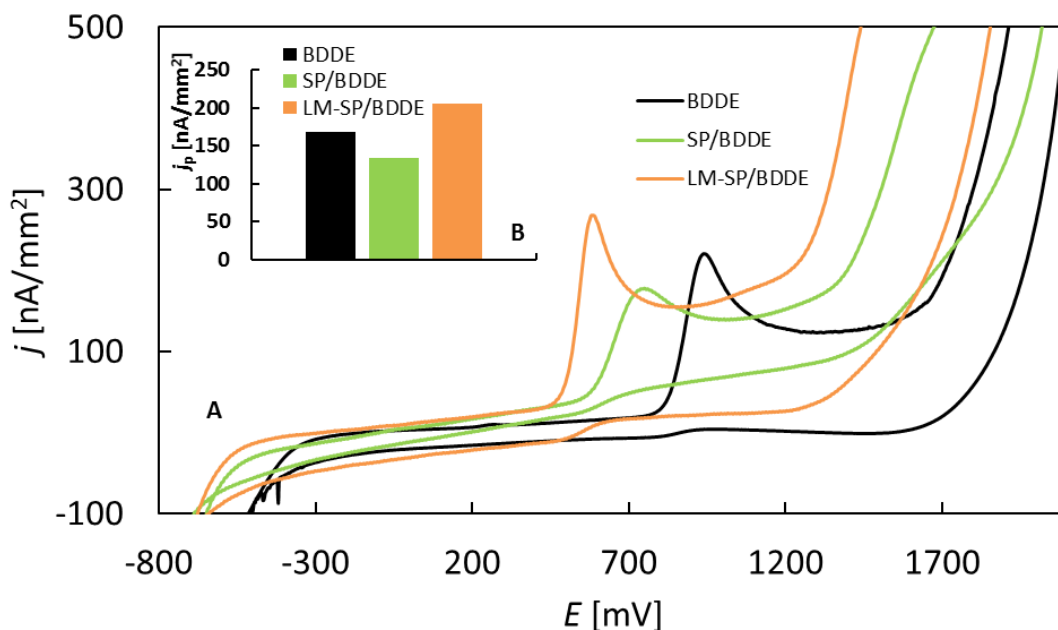
3.4.1 Porovnání voltametrického chování TNX na testovaných elektrodách

Nejprve bylo provedeno měření TNX o koncentraci $5,0 \times 10^{-5}$ mol/l metodou CV pro každou elektrodu. Měření probíhalo v prostředí BRB o pH 2, v rozsahu potenciálů od -1000 mV do $+2300$ mV při 100 mV/s. Získané cyklické voltamogramy jsou uvedeny na obrázku 36. Všechny testované elektrody poskytly jeden anodický signál a reakce byla ireverzibilní. Zatímco pro BDDE byl potenciál píku okolo $+1000$ mV, u tištěných senzorů došlo k posunu píku k méně pozitivním hodnotám potenciálu. Konkrétně na SP/BDDE byl potenciál píku okolo $+750$ mV, v případě LM-SP/BDDE byl potenciál okolo $+580$ mV.



Obrázek 36 Cyklické voltamogramy TNX o koncentraci $5,0 \times 10^{-5}$ mol/l v prostředí BRB o pH 2 zaznamenané na BDDE, SP/BDDE a LM-SP/BDDE, $E_{poč} = -1000$ mV, $E_{obratu} = +2300$ mV, $v = 100$ mV/s

Následně byla proudová odezva (I) přepočítána na proudovou hustotu (j). Získané cyklické voltamogramy jsou uvedeny na obrázku 37. Z vloženého sloupcového grafu vyplývá, že LM-SP/BDDE poskytla nejvyšší proudovou hustotu při analýze TNX ($j_p = 205,793$ nA/mm²) a SP/BDDE naopak nejnižší ($j_p = 134,39$ nA/mm²). Tento výsledek svědčí o velmi dobrých elektrochemických vlastnostech testovaného LM senzoru.

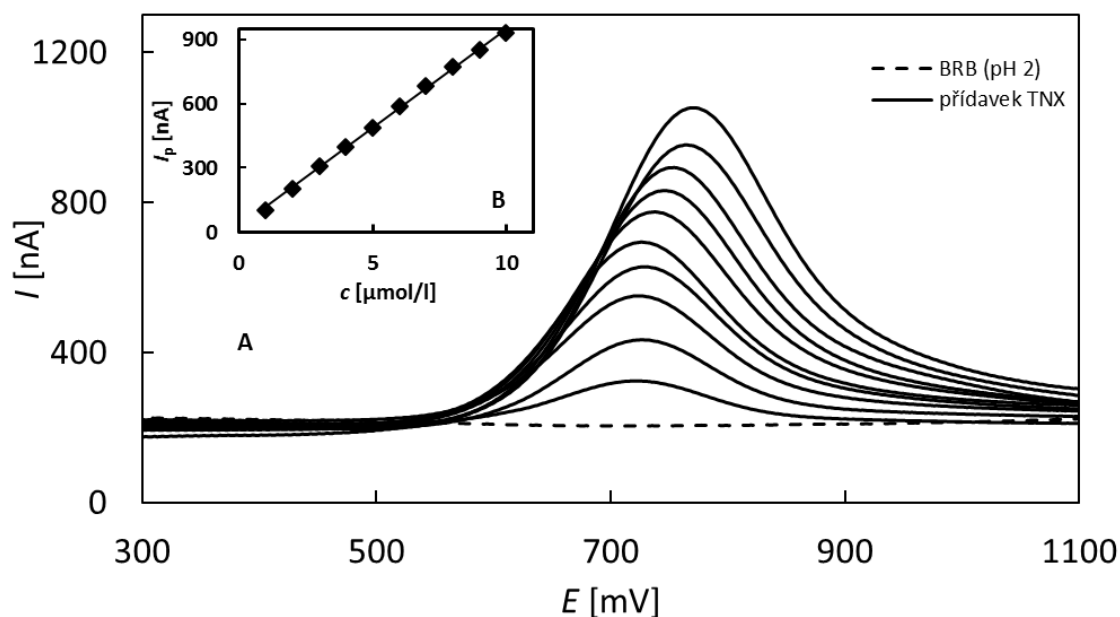


Obrázek 37 A – Cyklické voltamogramy TNX o koncentraci $5,0 \times 10^{-5}$ mol/l v prostředí BRB o pH 2 zaznamenané na BDDE, SP/BDDE a LM-SP/BDDE po přepočtu na proudové hustoty, $E_{poč} = -1000$ mV, $E_{obratu} = +2300$ mV, $v = 100$ mV/s, B – závislost j_p na použité elektrodě

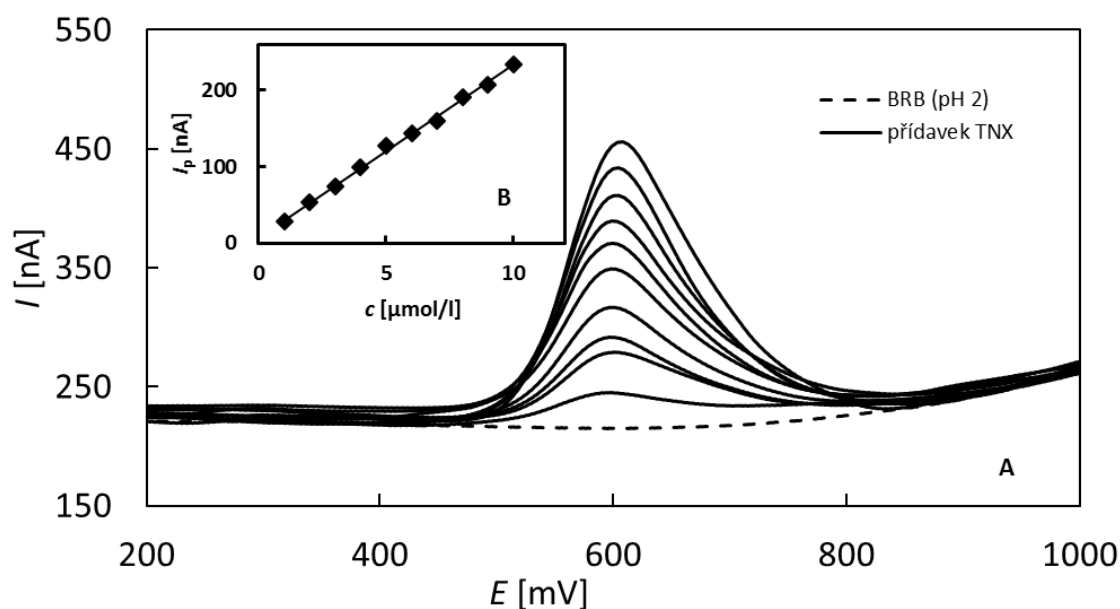
3.4.2 Analýza modelových roztoků tenoxikamu

Pro všechny 3 testované senzory byly změřeny koncentrační závislosti TNX v rozsahu $1,0 \times 10^{-6}$ – $1,0 \times 10^{-5}$ mol/l v prostředí BRB (pH 2) metodou SWV za optimalizovaných podmínek, které jsou uvedeny v popisících obrázků 38 pro SP/BDDE a 39 pro LM-SP/BDDE. Je třeba uvést, že celé série měření probíhaly vždy na jedné SPE, která tedy nebyla používána jako jednorázový senzor, ale jako klasická elektroda. Jak je vidět ze zmíněných obrázků, výška píku rostla v testovaném rozsahu lineárně s koncentrací analytu pro oba typy tištěných elektrod. Na obrázku 40 jsou zobrazeny závislosti I_p na c_{TNX} pro všechny 3 elektrody a tytéž závislosti po přepočtu na proudovou hustotu. Statistické parametry vypočtené pro TNX ze závislosti proudové hustoty na koncentraci analytu jsou uvedeny v tabulce 5. Hodnota směrnice je nejvyšší pro SP/BDDE je $(10,19 \pm 0,12)$, pak následuje LM-SP/BDDE $(7,333 \pm 0,049)$ a nejnižší směrnici poskytla závislost naměřená na klasické BDDE $(4,841 \pm 0,047)$. Z těchto výsledků vyplývá, že oba tištěné senzory vykazují větší citlivost než BDDE. Na obrázku 38 je vidět značná nestabilita potenciálu píku, resp. posun k pozitivnějším potenciálům při měření s SP/BDDE. To může být způsobeno stárnutím, a tedy změnou povrchu referentní elektrody, která je v tomto případě tvořena uhlíkovou pastou. U LM-

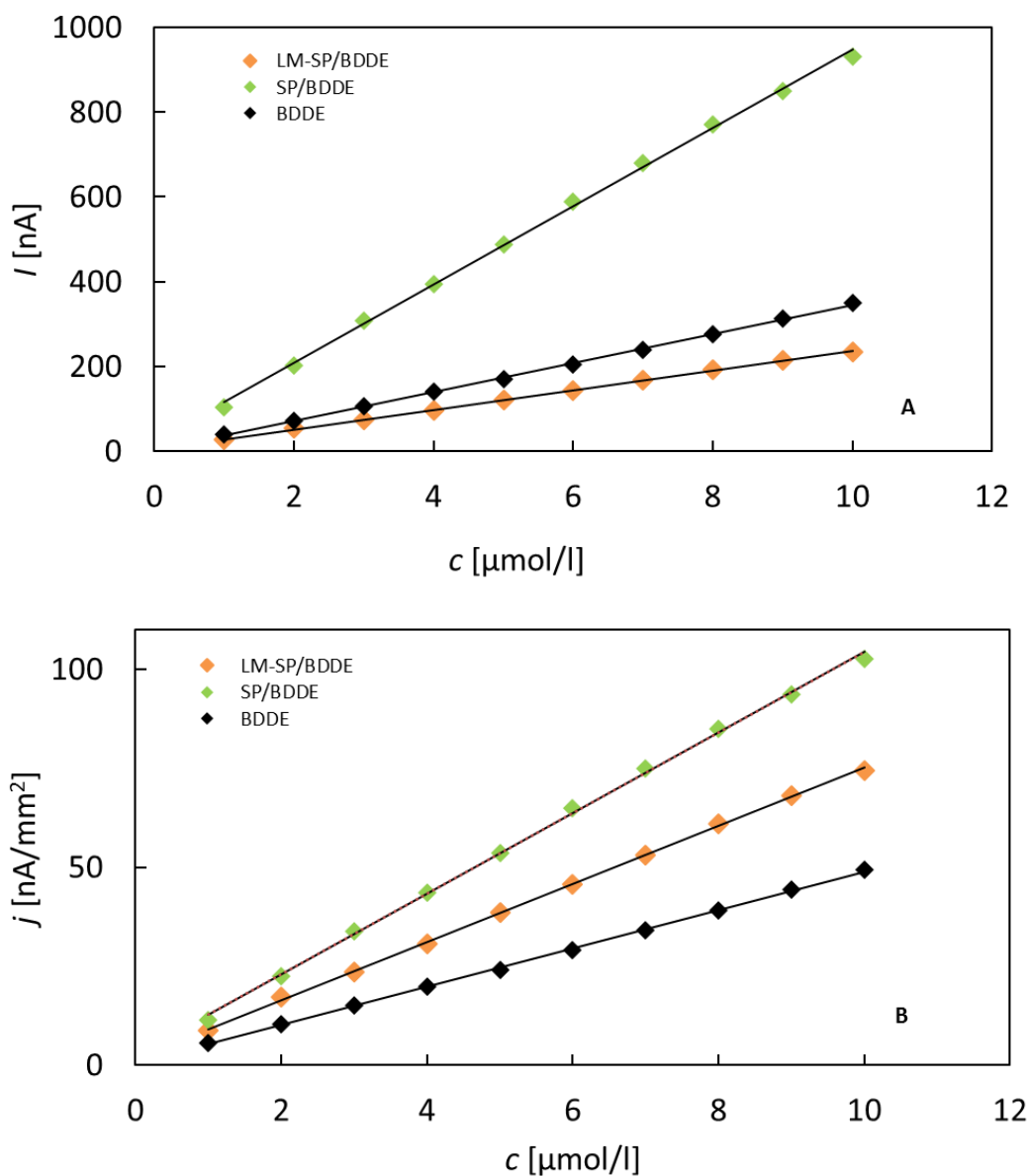
SP/BDDE nebyl potenciálový posun pozorován, což může být dáno vynikající stabilitou referenční elektrody, která je rovněž z borem dopovaného diamantu.



Obrázek 38 A – SW voltamogramy TNX zaznamenané na SP/BDDE v závislosti na koncentraci, BRB o pH 2, $E_{poč} = 0 \text{ mV}$, $E_{kon} = +2000 \text{ mV}$, $v = 40 \text{ mV/s}$, $A = +50 \text{ mV}$, $f = 30 \text{ Hz}$, $c_{TNX} = 1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$, B – závislost I_p na c



Obrázek 39 A – SW voltamogramy TNX zaznamenané na LM-SP/BDDE v závislosti na koncentraci, BRB o pH 2, $E_{poč} = 0 \text{ mV}$, $E_{kon} = +2000 \text{ mV}$, $v = 40 \text{ mV/s}$, $A = +50 \text{ mV}$, $f = 30 \text{ Hz}$, $c_{TNX} = 1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$, B – závislost I_p na c



Obrázek 40 A – Závislost výšky piku na koncentraci TNX pro všechny testované elektrody získané s využitím SWV ve spojení s BDDE, BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, $A = +50$ mV, $f = 30$ Hz, $c_{TNX} = 1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-5}$ mol/l; B – tytéž závislosti po přepočtu na proudovou hustotu

Tabulka 5 Statistické parametry vypočtené pro TNX ze závislosti proudové hustoty na koncentraci získaných s využitím SWV ve spojení s jednotlivými testovanými senzory

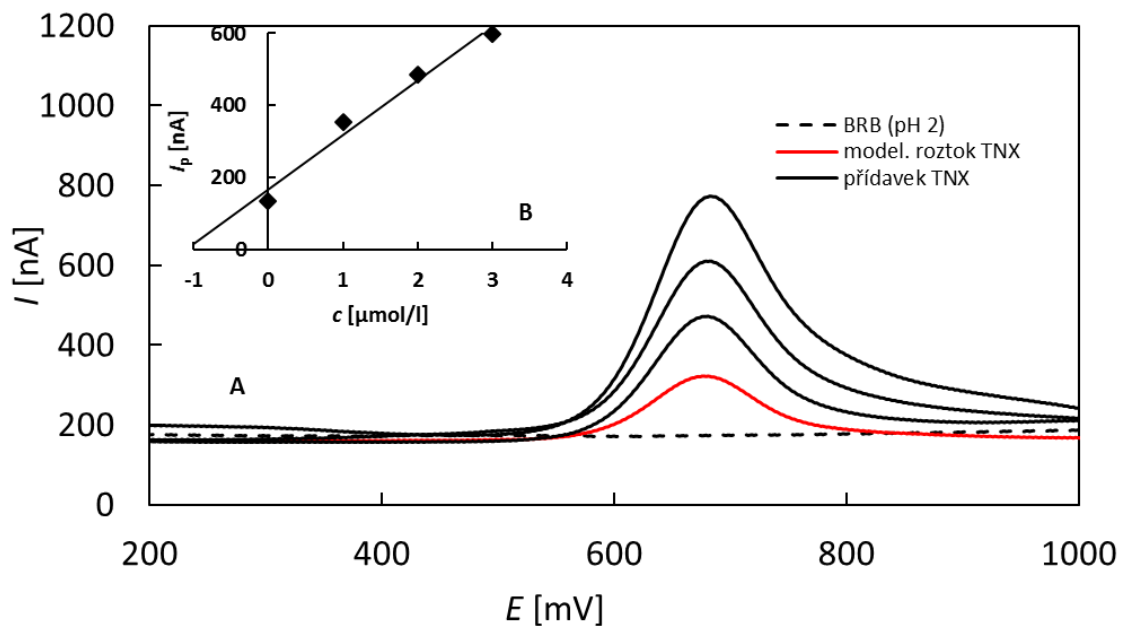
	Směrnice	Úsek	r
	[nA l / mm ² μmol]	[nA/mm ²]	
BDDE	(4,841±0,047)	(0,43±0,29)	0,999
SP/BDDE	(10,18±0,12)	(2,59±0,77)	0,998
LM-SP/BDDE	(7,333±0,049)	(1,75±0,30)	0,999

Další experiment v této kapitole byl zaměřen na ověření opakovatelnosti měření s využitím obou variant SPE. V roztoku TNX o koncentraci $5,0 \times 10^{-6}$ mol/l v prostředí BRB o pH 2 bylo změřeno celkem 11 opakovaných SW voltametrických křivek. Poté byly vyhodnoceny výšky píků a vypočteny statistické parametry, které jsou shrnuty v tabulce 6. Pro porovnání jsou zařazeny i výsledky pro klasickou BDDE, které již byly prezentovány výše. Z výsledků je vidět, že při opakování měření nedocházelo k významné změně výšky proudového signálu TNX. Vypočítaná relativní směrodatná odchylka pro SP/BDDE ($RSD_{11} = 4,02$ %) a LM-SP/BDDE ($RSD_{11} = 4,5$ %) svědčí o velmi dobré opakovatelnosti měření. Tyto elektrody tedy mohou sloužit nejen jako jednorázové senzory, ale mohou být používány také opakovaně pro celé série měření a analýz.

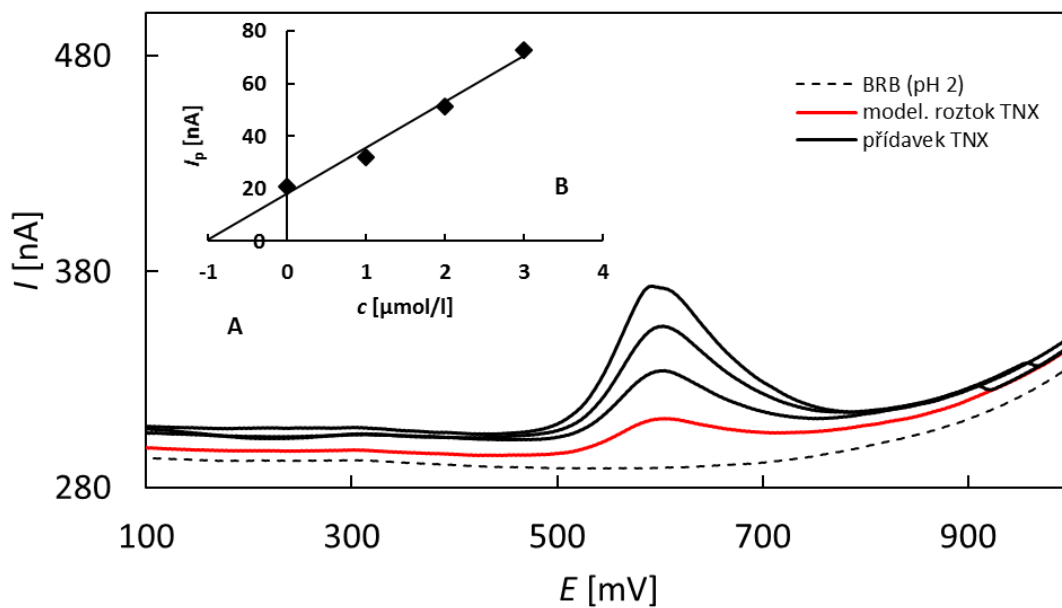
Tabulka 6 Statistické parametry opakovaného měření TNX o koncentraci $5,0 \times 10^{-6}$ mol/l metodou SWV na všech testovaných pracovních elektrodách

	I_p [nA]	RSD_{11} [%]
BDDE	179,6±3,2	1,9
SP/BDDE	747±31	4,1
LM-SP/BDDE	110,5±5,0	4,5

Tištěné elektrody byly stejně jako BDDE použity při opakovaném stanovení TNX v modelových roztocích. V tomto případě byla zvolena jen 1 koncentrace analytu $1,0 \times 10^{-6}$ mol/l. Pro analýzu byla opět použita metoda přidavku standardního roztoku ($c = 1,0 \times 10^{-3}$ mol/l). Stanovení bylo 5× zopakováno. Na obrázku 41 (SP/BDDE) a 42 (LM-SP/BDDE) jsou uvedeny příklady provedených analýz a výsledky jsou shrnuty v tabulce 7. Pro porovnání jsou opět uvedeny i výsledky dosažené v předchozí části práce pro BDDE. Z tabulky vyplývá, že všechny testované elektrody umožňují dosažení správných výsledků. Z hodnot RSD_5 je navíc zřejmé, že stanovení byla velice dobře opakovatelná. Výsledkem těchto experimentů je zjištění, že SPE mohou být úspěšně použity pro stanovení TNX v modelových roztocích.



Obrázek 41 A – Analýza modelového roztoku TNX o koncentraci $1,0 \times 10^{-6}$ mol/l metodou standardního přidavku s využitím SWV ve spojení s SP/BDDE, BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, $A = +50$ mV, $f = 30$ Hz, modelový roztok: 5 ml, standardní přidavek: $V = 5$ μ l, $c_{TNX} = 1,0 \times 10^{-3}$ mol/l, B – závislost I_p na c



Obrázek 42 A – Analýza modelového roztoku TNX o koncentraci $1,0 \times 10^{-6}$ mol/l metodou standardního přidavku s využitím SWV ve spojení s LM-SP/BDDE, BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, $A = +50$ mV, $f = 30$ Hz, modelový roztok: 5 ml, standardní přidavek: $V = 5$ μ l, $c_{TNX} = 1,0 \times 10^{-3}$ mol/l, B – závislost I_p na c

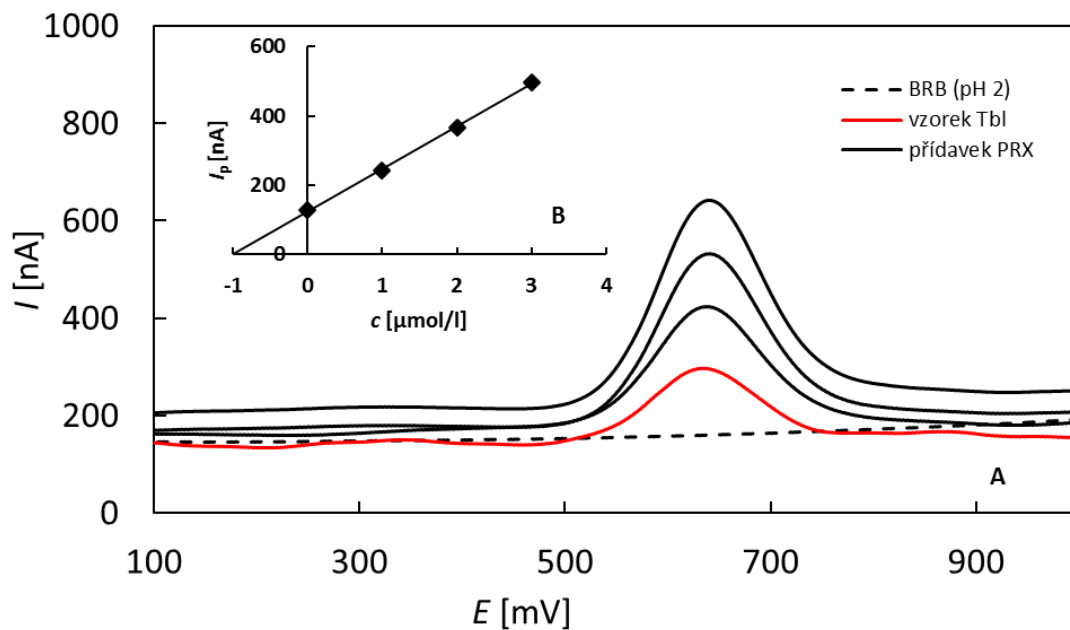
Tabulka 7 Výsledky opakovaného stanovení TNX v modelovém roztoku s využitím SWV ve spojení s BDDE, SP/BDDE a LM-SP/BDDE

	<i>c</i>	Stanoveno	<i>RSD</i> ₅	Výtěžnost
	[mol/l]	[mol/l]	[%]	[%]
BDDE	$1,0 \times 10^{-6}$	$(1,006 \pm 0,014) \times 10^{-6}$	1,5	98,3-102,7
SP/BDDE	$1,0 \times 10^{-6}$	$(0,998 \pm 0,010) \times 10^{-6}$	1,0	98,3-101,4
LM-SP/BDDE	$1,0 \times 10^{-6}$	$(0,995 \pm 0,011) \times 10^{-6}$	1,2	96,7-100,9

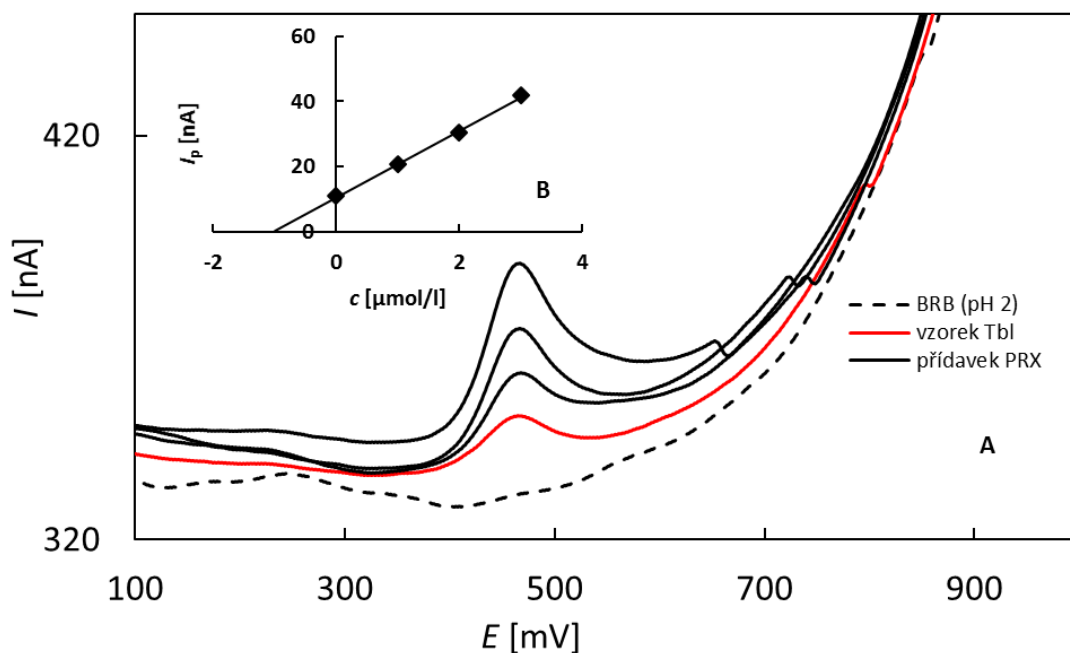
3.4.3 Analýza farmaceutického přípravku

Poslední kapitola v této diplomové práci je věnována analýze farmaceutických přípravků pomocí testovaných tištěných elektrod. Z časových důvodů byl analyzován pouze jeden z přípravků s obsahem oxycamových léčiv, konkrétně se jednalo o Flamexin, který obsahuje jako účinnou látku piroxicam (20 mg/Tbl.). Příprava vzorku byla popsána v Experimentální části v kapitole 2.3.3 Analýza farmaceutických přípravků. Měření probíhalo pomocí nově vyvinuté SW voltametrické metody a vyhodnocení koncentrace PRX pomocí SEM. Stanovení léčiva bylo opět 5× zopakováno a z výsledků měření bylo vypočteno množství účinné látky na tabletu s příslušným intervalem spolehlivosti, výtěžnost a *RSD*₅. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 8. Příklady SW voltamogramů s grafickým vyhodnocením SAM jsou zobrazeny na obrázku 43 pro SP/BDDE a 44 pro LM-SP/BDDE. Z tabulky vyplývá, že s využitím BDDE, SP/BDDE i LM-SP/BDDE byly stanoveny koncentrace PRX odpovídající hodnotě deklarované výrobcem, a že stanovení bylo velmi dobře opakovatelné (*RSD*₅ < 3,5 %).

Je tedy zřejmé, že byla vyvinuta metoda stanovení TNX s využitím SWV a BDDE, která může být využita rovněž ke stanovení dalších oxycamových léčiv, a to jak v modelových roztocích, tak v praktických vzorcích farmaceutických přípravků. Navíc je tato metoda použitelná i po převedení na SPE.



Obrázek 43 A – Analýza farmaceutického přípravku Flamexin metodou standardního přidavku s využitím SWV ve spojení s SP/BDDE, BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, $A = +50$ mV, $f = 30$ Hz, roztok vzorku: $V = 5$ ml BRB + 8,3 μ l roztoku Tbl., standardní přidavek: $V = 5$ μ l, $c_{PRX} = 1,0 \times 10^{-3}$ mol/l, B – závislost I_p na c



Obrázek 44 A – Analýza farmaceutického přípravku Flamexin metodou standardního přidavku s využitím SWV ve spojení s LM-SP/BDDE, BRB o pH 2, $E_{poč} = 0$ mV, $E_{kon} = +2000$ mV, $v = 40$ mV/s, $A = +50$ mV, $f = 30$ Hz, roztok vzorku: $V = 5$ ml BRB + 8,3 μ l roztoku Tbl., standardní přidavek: $V = 5$ μ l, $c_{PRX} = 1,0 \times 10^{-3}$ mol/l, B – závislost I_p na c

Tabulka 8 Výsledky opakovaného stanovení PRX ve farmaceutickém přípravku s využitím SWV ve spojení s BDDE, SP/BDDE a LM-SPBDDE

	Deklarováno [mg/Tbl.]	Stanoveno [mg/Tbl.]	RSD_5 [%]	Výtěžnost* [%]
BDDE	20	(20,31±0,46)	1,3	98,2-101,8
SP/BDDE	20	(20,65±0,72)	3,3	94,6-103,7
LM-SP/BDDE	20	(20,41±0,45)	2,2	97,4-103,9

* Výtěžnost byla vypočtena z hodnot obsahů účinných látek v tabletách deklarovaných výrobcí.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo studium voltametrického chování protizánětlivého léčiva tenoxicamu (TNX) a vývoj metody pro jeho stanovení s využitím borem dopované diamantové elektrody (BDDE).

První část práce je věnována studiu voltametrického chování TNX na BDDE. Pomocí CV bylo zjištěno, že TNX poskytuje jeden oxidační pík při potenciálu okolo +1100 mV, který by měl podle literatury (Bozal, 2010, Torriero, 2006) odpovídat oxidaci hydroxylové skupiny. Dále bylo zjištěno, že optimálním pro analýzu je kyselé prostředí, přičemž pH základního elektrolytu má významný vliv jak na výšku, tak na potenciál píku. Závislosti na rychlosti polarizace pak ukázaly, že řídicím dějem sledované oxidační reakce je s největší pravděpodobností kinetika s významným vlivem difuze.

Další část práce byla zaměřena na vývoj voltametrické metody stanovení TNX. Nejprve byl s využitím DPV vybrán jako vhodný základní elektrolyt BRB o pH 2. Vzhledem k velmi dobré citlivosti byly pro stanovení TNX testovány metody DPV a SWV. Pro obě byly optimalizovány základní parametry jako je rychlost polarizace, výška a šířka pulzu pro DPV a rychlost polarizace, amplituda a frekvence pulzu pro SWV. V neposlední řadě byly testovány možnosti předúpravy, resp. aktivace BDDE. Po nastavení optimálních parametrů byla proměřena řada koncentračních závislostí v modelových roztocích TNX s využitím obou metod ve spojení s BDDE a byly vypočteny základní statistické parametry jako LDR, LOD a LOQ. Na základě výsledků těchto experimentů byla pro stanovení TNX jako vhodnější vybrána SWV, která pak byla používána při všech následujících měřeních.

Vyvinutá metoda byla otestována při opakovaném stanovení TNX a poté i dalších oxycamových léčiv, které poskytují rovněž oxidační pík odpovídající oxidaci hydroxylové skupiny, v modelových roztocích o různých koncentracích. Ukázalo se, že SWV ve spojení s BDDE umožňuje dosažení správných a dobře opakovatelných výsledků ($RSD_5 < 3\%$) pro všechny studované analyty. Vzhledem k tomu, že v České republice není dostupný lék, který by jako účinnou látku obsahoval TNX, byla nová metoda aplikována při analýze léčiv s účinnými látkami meloxicam, piroxicam a lornoxicam a ve všech případech poskytla správné a dobře opakovatelné výsledky.

V poslední části experimentální práce byla navržená metoda pro stanovení TNX vyvinutá pomocí klasické BDDE přenesena na tištěné elektrody s BDDE jako pracovní. Konkrétně byly testovány komerčně dostupná SP/BDDE a laboratorně vyrobená (LM) SP/BDDE. Bylo

zjištěno, oba tyto senzory umožňují stanovení TNX i ostatních léčiv, a to jak v modelových roztocích, tak ve farmaceutických přípravcích. Navíc v porovnání s BDDE poskytují citlivější odezvu vztaženou k velikosti elektroaktivní plochy. Dalším zajímavým zjištěním bylo, že tyto senzory lze využívat opakovaně jako běžné diskové elektrody a jejich odezva je velmi dobře opakovatelná. Primárně jde v případě SPE samozřejmě o možnost jejich využití jako jednorázových senzorů. Mimo biomedicínské aplikace však může být výhodou i stabilita umožňující jejich dlouhodobé použití, protože cena těchto SP/BDDE je zatím poměrně vysoká.

Na závěr je možné říci, že cíl této diplomové práce byl splněn. Byla vyvinuta SWV metoda, která byla úspěšně aplikována při analýze TNX i dalších oxycamových léčiv v modelových roztocích i farmaceutických přípravcích.

POUŽITÁ LITERATURA

AGIN, F.; ATAL, S., Electroanalytical Determination of the Anti-inflammatory Drug Tenoxicam in Pharmaceutical Dosage Forms/Anti-enflamatuvar Ilac Tenoksikamin Farmasotik Dozaj Formlarından Elektroanalitik Miktar Tayini. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 184-191.

AGUIRRE-GOMEZ, A., MCBRIDE, M., NORVELL, W., A voltammetric method for determining free metal activities in aqueous solutions: Part I, direct current voltammetry of Cd, Cu, and Pb, *International Journal of Environment and Pollution*, 2006, 26: 41-67.

ALBERY, WJ.; HILLMAN, A. R. Modified electrodes. Annual Reports Section "C" (*Physical Chemistry*), 1981, 78: 377-437.

BARD, AJ; FAULKNER, LR. *Electrochemical methods fundamentals and applications*. John Wiley & Sons, 2001, ISBN 0-471-04372-9

AL-OBAID, AM., MIAN, MS., Tenoxicam. In: Analytical profiles of drug substances and excipients. *Academic Press*, 1993. p. 431-459.

AMMAR, H. O., GHORAB, M., EL-NAHHAS, SA., Proniosomes as a carrier system for transdermal delivery of tenoxicam. *International journal of pharmaceutics*, 2011, 405.1-2: 142-152.

ATKOPAR, Z., TUNÇEL, M., The polarographic determination of tenoxicam in the pharmaceutical preparations. *Analytical letters*, 1996, 29.13: 2383-2397.

BALUCHOVÁ, S, DAŇHEL, A., DEJMKOVÁ, H., OSTATNÁ, V., Recent progress in the applications of boron doped diamond electrodes in electroanalysis of organic compounds and biomolecules—a review. *Analytica chimica acta*, 2019, 1077: 30-66.

BAREK, J.; OPEKAR, F.; ŠTULÍK, K., *Elektroanalytická chemie*. Karolinum, 2005.

BAREK, J., FISCHER, J., NAVRÁTIL, T., PECKOVÁ, K., YOSYPCHUK, B., ZIMA, J., Nontraditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 2007, 19.19-20: 2003-2014.

BARÓN-JAIMEZ, J.; JOYA, M. R.; BARBA-ORTEGA, J. Anodic stripping voltammetry—ASV for determination of heavy metals. In: *Journal of Physics: Conference Series*. IOP Publishing, 2013. p. 012023.

BALUCHOVÁ, S., NEDVĚD, M., VOSÁHLOVÁ, J., Boron-Doped Diamond Electrodes: The Role of Doping Level and Surface Treatment in the Electrooxidation of m-Cresol,

- Conference: International Conference on Electrochemical Methods XXXIX, Location: Jetrichovice, Czech republic, Date: May 20-24, 2019, Published: 2019, Page 9-13.
- BOTTARI, F.; DE WAEL, K. Electrodeposition of gold nanoparticles on boron doped diamond electrodes for the enhanced reduction of small organic molecules. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2017, 801: 521-526.
- BOZAL, B., USLU, B., Applications of carbon based electrodes for voltammetric determination of lornoxicam in pharmaceutical dosage form and human serum. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 2010, 13.7: 599-609.
- BRILLAS, E., MART, CA., *Synthetic diamond films: preparation, electrochemistry, characterization, and applications*. John Wiley & Sons, 2011, ISBN 978-0-470-48758-7.
- BRYCHT, M., β -Cyclodextrin and multiwalled carbon nanotubes modified boron-doped diamond electrode for voltammetric assay of carbendazim and its corrosion inhibition behavior on stainless steel. *Ionics*, 2018, 24.3: 923-934.
- YOSYPCHUP, B., NAVRÁTIL, T., LUKINA, A.N., PECKOVÁ, K., BAREK, J.,: Solid amalgam composite electrode as a new sensor for the determination of biologically active compounds. *Chem. Anal. (Warsaw)*, 2007, 52: 897-910.
- BUTLER, JAV., ZUMAN, P., 1890-1967 Jaroslav Heyrovský, *Biogr. Mem. Fell. R. Soc.*, 1967, 13: 167-191.
- CHANDEL, S., BARHATE, CR., SRIVASTAVA, AR., Development and validation of HPTLC method for estimation of tenoxicam and its formulations. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 2012, 74.1: 36.
- Chemistry Library [online]. 2019 [cit. 2019-12-08]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Analytical_Sciences_Digital_Library/JASDL/Courseware/Analytical_Electrochemistry%3A_The_Basic_Concepts/05_Experimental_Hardware/B._Reference_and_Auxiliary_Electrodes](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Analytical_Sciences_Digital_Library/JASDL/Courseware/Analytical_Electrochemistry%3A_The_Basic_Concepts/05_Experimental_Hardware/B._Reference_and_Auxiliary_Electrodes)
- COMPTON, RG.; FOORD, JS.; MARKEN, F., Electroanalysis at diamond-like and doped-diamond electrodes. *Electroanalysis*, 2003, 15.17: 1349-1363.
- COPELAND, T. R.; SKOGERBOE, R. K. Anodic stripping voltammetry. *Analytical Chemistry*, 1974, 46.14: 1257A-1268a.
- Český lékopis 1997: Pharmacopoea bohémica MCMXCVII : (Ph. B. XCVII). 3. díl, Léčivé a pomocné látky, M-Z.. Praha: Grada, 1997, ISBN 80-7169-625-0.

- DĚDÍK, J., JANOVCOVÁ, M., DEJMKOVÁ, H., BAREK, J., PECKOVÁ, K., Utilization of unmodified screen-printed carbon electrodes in electroanalysis of organic compounds. *Sensing in Electroanalysis* 2011, 6: 129-138.
- DĚDÍK, J., VYSKOČIL, V., DAŇHEL, A., BAREK, J., elektrody komozitní. Voltametrické stanovení ekotoxických nitrovaných sloučenin pomocí leštěné stříbrné pevné amalgámové. *Chem. Listy*, 2012, 106: 217-223.
- DEKANSKI, A., STEVANOVIĆ, J., NIKOLIĆ, BŽ, Glassy carbon electrodes: I. Characterization and electrochemical activation. *Carbon*, 2001, 39.8: 1195-1205.
- ECONOMOU, A.; FIELDEN, P. R. Mercury film electrodes: developments, trends and potentialities for electroanalysis. *Analyst*, 2003, 128.3: 205-213.
- EINAGA, Y., SATO, R., OLIVIA, H., SHIN, D., Modified diamond electrodes for electrolysis and electroanalysis applications. *Electrochimica Acta*, 2004, 49.22-23: 3989-3995.
- EL-MAALI, NA., VIRE, JC., PATRIARCHE, GJ., Square wave and square wave adsorptive stripping voltammetric comparison of the anti-inflammatory drugs piroxicam and tenoxicam. *Analytical sciences*, 1990, 6.2: 245-250.
- FATMA, A., SENA, A., Electroanalytical Determination of the Antiinflammatory Drug Tenoxicam in Pharmaceutical Dosage Forms. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 16.2: 184.
- FISCHER, J., DEJMKOVA, H., BAREK, J., Electrochemistry of pesticides and its analytical applications. *Current Organic Chemistry*, 2011, 15.17: 2923.
- FUJISHMA, A., EINAGA, Y., RAO, T.N, TRYK, D.A.: Diamond electrochemistry. *Electrochimica Acta* 51, Elsevier B.V., Amsterdam, 2005, ISBN 0-444-51908-4
- GIRAULT, H., *Voltammetric method and apparatus*. U.S. Patent, 1997, No 5,686,829.
- GONZALES, J. P.; TODD, P. A. Tenoxicam. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, 1987, 34: 289-310.
- GULABOSKI, R., PEREIRA, CM., Electroanalytical techniques and instrumentation in food analysis. *Handbook of food analysis instruments*, CRC Press, 2008, 379-402, ISBN 9781420045673.
- GUTH, U., GURLAH, F., DECKER, M., Solid-state reference electrodes for potentiometric sensors. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2009, 13.1: 27-39.

- GUZMÁN-HERNÁNDEZ, DS., RAMÍREZ-SILVA, MT., Electrochemical characterization of tenoxicam using a bare carbon paste electrode under stagnant and forced convection conditions. *Electrochimica acta*, 2012, 59: 150-155.
- HENZE, G., Analytical Voltammetry and Polarography. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley - VCH Verlag GmbH & Co, 2000, ISBN 9783527303854.
- HEYROVSKÝ J.: Elektrolysa se rtuťovou kapkovou elektrodou. *Chemické Listy*, 1922, 16: 255-264
- IVANDINI T.A., MAKIDE, S., Y., FUJISHIMA, A., SATO, R.: Electroanalytical application of modified diamond electrodes. *Diamond Relat. Mater.*, 2004, 13: 2003–2008.
- JI, HY., LEE, HY., KIM, YH., JEONG, DW., LEE HS Simultaneous determination of piroxicam, meloxicam and tenoxicam in human plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2005, 826.1-2: 214-219.
- JIWANTI, PK., ARITONANG, RP., ABDULLAH, I., Copper-nickel-modified Boron-doped Diamond Electrode for CO₂ Electrochemical Reduction Application: A Preliminary Study. *Makara Journal of Science*, 2019, 23.4: 5.
- KATZMANN, W., Tenoxicam. *Drug Investigation*, 1990, 2.3: 31-37.
- KONDO, T., SAKOMOTO, H., KATO, T., HORITANI, M., Screen-printed diamond electrode: A disposable sensitive electrochemical electrode. *Electrochemistry communications*, 2011, 13.12: 1546-1549.
- KRAFT, A.: Doped diamond: a compact review on a new, versatile electrode material. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2007, 2.5: 355–385.
- LORA, M., MORISSET, S., MÉNARD, HA., LEDUC, R., Expression of recombinant human cyclooxygenase isoenzymes in transfected COS-7 cells in vitro and inhibition by tenoxicam, indomethacin and aspirin. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 1997, 56.5: 361-367.
- LUONG, JHT; MALE, KB.; GLENNON, JD., Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications. *Analyst*, 2009, 134.10: 1965-1979.
- KALCHER, K., Chemically modified carbon paste electrodes in voltammetric analysis. *Electroanalysis*, 1990, 2.6: 419-433.
- KALVODA, R., BAREK, J., DŘEVÍNEK, M., Adsorpční rozpouštěcí metody v elektroanalýze-databáze aplikací, *Chem. listy*, 2001, 95: 82-85

- KOLÁŘOVÁ, H., ŠEDIVÝ, V., ŠULC, R., *Základy fyzikální chemie*. Nakladatelství ČVUT, 2007.
- KISSINGER, PT.; HEINEMAN, WR. Cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 1983, 60.9: 702.
- KOUNAVES, SP., Voltammetric techniques. *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*, Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, New Jersey, 1997, 709-726, ISBN 0-13-177338-0
- KŘÍŽEK, M., ŠÍMA, J., BUDĚJOVICE, České. *Analytická chemie*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2015.
- KŘÍŽENECKÁ, S., SYNEK, V., *Základy analytické chemie*. Univerzita JE Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, 2014.
- KUTNER, W., WANG, J., L'HER, M., Analytical aspects of chemically modified electrodes: Classification, critical evaluation and recommendations (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and Applied Chemistry*, 1998, 70.6: 1301-1318.
- LOURENCAO, BC., AZZI, DC., SILVA, TA., OLIVEIRA, PR., Analytical Applications of Electrochemically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrodes. *ChemElectroChem*, 2020, 7.6: 1291-1311.
- LUONG, JHT., MALE, KB.; GLENNON, JD., Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications. *Analyst*, 2009, 134.10: 1965-1979.
- MAVROKEFALOS, ChK., NELSON, GW., POLL, CG., Electrochemical aspects of Pt–Cu and Cu modified boron-doped diamond. *physica status solidi (a)*, 2015, 212.11: 2559-2567.
- MUNERA-JARAMILLO, MI.; BOTERO-GARCES, S. Determination of tenoxicam in plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1993, 616.2: 349-352.
- MUSILOVÁ, J., BAREK, J., PECKOVÁ, K., Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem pro stanovení organických látek. *Chem. Listy*, 2009, 103.6: 469-478.
- NIDHEESH, P. V., DIVYAPRIYA, G., OTURAN, N., Environmental applications of boron-doped diamond electrodes: 1. Applications in water and wastewater treatment. *ChemElectroChem*, 2019, 6.8: 2124-2142.
- NILSEN, OG., Clinical pharmacokinetics of tenoxicam. *Clinical pharmacokinetics*, 1994, 26.1: 16-43.

- PLESKOV, YV., Electrochemistry of diamond: A review. *Russian Journal of Electrochemistry*, 2002, 38.12: 1275-1291.
- OLKKOLA, KT.; BRUNETTO, AV.; MATTILA, MJ. Pharmacokinetics of oxycam nonsteroidal anti-inflammatory agents. *Clinical pharmacokinetics*, 1994, 26.2: 107-120.
- OPEKAR, F., JELÍNEK, I., RYCHLOVSKÝ, P., PLZÁK, Z., Základní analytická chemie. UK, Karolinum, Praha, 2002.
- OSTERYOUNG, JG.; OSTERYOUNG, RA., Square wave voltammetry. *Analytical Chemistry*, 1985, 57.1: 101-110.
- OZKAN, SA, . *Electroanalytical Methods in Pharmaceutical Analysis and Their Validation*. 1. New York: HNB Publishing, 2012, ISBN 978-0-96642-867-4.
- ÖZALTIN, N., Differential pulse polarographic determination of tenoxicam in pharmaceuticals and added to blood. *Analytica chimica acta*, 2000, 406.2: 183-189.
- ROELOFSE, JA.; VAN DER BIJL, P.; JOUBERT, J. J. Analgesic and anti-inflammatory efficacy of tenoxicam and diclofenac sodium after third molar surgery. *Anesthesia progress*, 1996, 43.4: 103.
- SADIKOGLU, M., CABUK, A., Voltammetric Determination of Tenoxicam in Drug Formulation at Modified Glassy Carbon Electrode. *Int. J. Electrochem. Sci*, 2019, 14: 4508-4519.
- SCHOLZ, F., *Electroanalytical methods*. Berlin: Springer, 2010, ISBN 978-3-642-02915-8.
- SCHOLZ, F., Voltammetric techniques of analysis: the essentials. *ChemTexts*, 2015, 1.4: 17.
- SCHREURS, J. P. G. M.; BARENDRECHT, E. Surface-modified electrodes (SME). *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 1984, 103.7-8: 205-219.
- SVÍTKOVÁ, J, LABUDA, J., IGNAT, T., Chemical modification of boron-doped diamond electrodes for applications to biosensors and biosensing. *Critical reviews in analytical chemistry*, 2016, 46.3: 248-256.
- SWAIN, GM., RAMESHAM, R., The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline diamond thin film electrodes. *Analytical chemistry*, 1993, 65.4: 345-351.
- SWAIN, GM., Solid electrode materials: pretreatment and activation. In: *Handbook of electrochemistry*. Elsevier, 2007. p. 111-153.
- SWAIN G.M., ANDERSON A.B., Angus J.C.: Applications of diamond thin films in electrochemistry. *MRS Bulletin* 23 ,1998, 23.9: 56–60

ŠELEŠOVSKÁ R., HLOBEŇOVÁ F, SKOPALOVÁ J., Electrochemical oxidation of anti-inflammatory drug meloxicam and its determination using boron doped diamond electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.113758>

Tenoxicam. PubChem [online]. U.S. National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information., 2011 [cit. 2021-03-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tenoxicam>

TODD, PA., CLISSOLD, SP., Tenoxicam. *Drugs*, 1991, 41.4: 625-646.

TOGHILL, KE.; COMPTON, RG., Metal nanoparticle modified boron doped diamond electrodes for use in electroanalysis. *Electroanalysis*, 2010, 22.17-18: 1947-1956.

TOGHILL, KE., *Metal modified boron doped diamond electrodes and their use in electroanalysis*. 2011. PhD Thesis. Oxford University, UK.

TORRIERO, AAJ, SERENO L., RABA J., Electrooxidation mechanism of non-steroidal anti-inflammatory drug piroxicam at glassy carbon electrode. *Journal of electroanalytical chemistry*, 2006, 588.2: 218-225.

TSAI, RS, CARRUPT, PA., TAYAR, NE., Physicochemical and structural properties of non-steroidal anti-inflammatory oxicams. *Helvetica chimica acta*, 1993, 76.2: 842-854.

UCHIKADO, R., RAO, TN., TRYK, DA., Metal-modified diamond electrode as an electrochemical detector for glucose. *Chemistry Letters*, 2001, 30.2: 144-145.

USLU, B., OZKAN, SA., Solid electrodes in electroanalytical chemistry: present applications and prospects for high throughput screening of drug compounds. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 2007, 10.7: 495-513.

Ústav Fyzikální chemie J. Heyrovského, staženo z <https://www.jh-inst.cas.cz/news/av-cr-si-pripomene-60-vyroci-udeleni-nobelovy-ceny-jaroslavu-heyrovskemu>, 19. 11. 2019.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M., Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 1996, 25.sup102: 9-21.

VARGUS, EP., New research on electrochemistry. *Nova Publishers*, 2007, ISBN 1-60021-304-9

VYSKOČIL, V., DAŇHEL, A., FISCHER, J., NOVOTNÝ, V., Krása a užitečnost nových elektrodových materiálů. *Chem. Listy*, 2010, 104.12: 1181-1195.

XU J., GRANGER M.C., CHEN Q., STROKEJ J.W., LISTER T.E., SWAIN G.M.: Peer Reviewed: Boron-Doped Diamond Thin-Film Electrodes. *Anal. Chem.*, 1997, 69.19: 591A–597A

- XU, S., ROUZER, CA., MARNETT, LJ., Oxicams, a class of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and beyond. *IUBMB life*, 2014, 66.12: 803-811.
- YI, Y., WEINBERG, G., PRENZEL, M., GREINER, M., Electrochemical corrosion of a glassy carbon electrode. *Catalysis Today*, 2017, 295: 32-40.
- YOSYPCHUK, B., NAVRÁTIL, T., LUJINA, AN., Solid amalgam composite electrode as a new sensor for the determination of biologically active compounds. *Chemia Analityczna*, 2007, 52.6: 897.
- YOSYPCHUK, B., FOJTA, M., BAREK, J., Preparation and properties of mercury film electrodes on solid amalgam surface. *Electroanalysis*, 2010, 22.17-18: 1967-1973.
- YOSYPCHUK, B., NOVOTNÝ, L., Copper solid amalgam electrodes. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 2003, 15.2: 121-125.
- YOSYPCHUK, B., ŠESTÁKOVÁ, I., Working electrodes from amalgam paste for electrochemical measurements. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 2008, 20.4: 426-433.
- YOSYPCHUK, O., PECKOVÁ, K., BAREK, J., Voltammetric determination of 1-nitropyrene and 1-aminopyrene at a boron-doped diamond film electrode. *Chemické listy*, 2010, 104.3.
- YU, Y., ZHOU, Y., WU, L., ZHI, J., Electrochemical biosensor based on boron-doped diamond electrodes with modified surfaces. *International Journal of Electrochemistry*, 2012, 2012.
- ZAVÁZALOVÁ, J., BAREK, J., PECKOVÁ, K., Boron doped diamond electrodes in voltammetry: New designs and applications (an overview). *Sensing in Electroanalysis*. (K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytřas; Eds.). 2013/2014, Volume 8., 2014.
- ZUMAN, P., Electrolysis with a dropping mercury electrode: J. Heyrovsky's contribution to electrochemistry. *Critical reviews in analytical chemistry*, 2001, 31.4: 281-289.
- ZUMAN, P., Principles of applications of polarography and voltammetry in the analysis of drugs. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, 31.2: 97.
- ZUMAN, P., With the drop of mercury to the Nobel Prize, 1989