

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Voltametrické stanovení vybraných sulfonamidových léčiv

Aneta Fendrichová

Bakalářská práce

2021

University of Pardubice
Faculty of chemical technology

Voltammetric determination of selected sulfonamide drugs

Aneta Fendrichová

Bachelor thesis

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

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

Jméno a příjmení: **Aneta Fendrichová**
Osobní číslo: **C16086**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Voltamerické stanovení vybraných sulfonamidových léčiv**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. Popište stručně princip voltametrie a uveďte přehled základních voltametrických metod používaných v elektroanalytické chemii.
2. Zpracujte literární rešerši týkající se vybraných sulfonamidových léčiv sulfamethoxazolu a sulfisoxazolu. Zaměřte se na problematiku jejich voltametrického chování, resp. stanovení s využitím různých pracovních elektrod.
3. Ověřte experimentálně možnosti borem dopované diamantové elektrody při analýze a stanovení těchto léčiv na modelových roztocích, navrhnete optimální podmínky jejich stanovení a vyvinuté metody aplikujte při analýze farmaceutických přípravků.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí ÚPa č. 9/2012 „Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu“.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Renáta Selešovská, Ph.D.**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2020**

L.C.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 30. 6. 2021

Aneta Fendrichová

Poděkování

Ráda bych poděkovala především doc. Ing. Renátě Šelešovské, Ph.D. za odbornou pomoc a za veškeré cenné rady během experimentální části i zpracování textu této bakalářské práce. Dále děkuji všem, kteří mě během studia podporovali.

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

Anotace

Předmětem této bakalářské práce je studium voltametrického chování protizánětlivého léčiva sulfamethoxazolu (SMX) a vývoj metody jeho stanovení s využitím borem dopované diamantové elektrody (BDDE). Teoretická část je zaměřena jednak na SMX, jeho vlastnosti a metody stanovení, a jednak na princip voltametrie a možnosti této metody při stanovení studovaného léčiva. V rámci experimentální části bylo studováno elektrochemické chování SMX v závislosti na pH a rychlosti polarizace. Byla rovněž vyvinuta voltametrická metoda jeho stanovení s využitím diferenční pulzní voltametrie ve spojení s BDDE, která byla úspěšně aplikována při analýze modelových roztoků i komerčně dostupného farmaceutického přípravku.

Klíčová slova

Sulfonamidová léčiva, sulfamethoxazol, voltametrie, borem dopovaná diamantová elektroda

Annotation

The subject of this bachelor thesis is the study of the voltammetric behavior of the anti-inflammatory drug sulfamethoxazole (SMX) and the development of method for its determination using boron doped diamond electrode (BDDE). The theoretical part is focused on the SMX, its properties and methods of determination, and on the principle of voltammetry and the possibilities of this method in the determination of the studied drug. In the experimental part, the electrochemical behavior of SMX in dependence on pH and scan rate was investigated. The voltammetric method for its determination was also developed using differential pulse voltammetry in conjunction with BDDE. This method was successfully applied in the analysis of model solutions and commercially available pharmaceutical preparation.

Key words

Sulfonamide drugs, sulfamethoxazole, voltammetry, boron doped diamond electrode

Obsah

Úvod	13
1. Teoretická část	14
1.1. Sulfamethoxazol	14
1.1.1. Sulfonamidová léčiva.....	14
1.1.2. Sulfamethoxazol	15
1.1.3. Možnosti stanovení sulfamethoxazolu.....	17
1.2. Voltametrie.....	19
1.2.1. Úvod do polarografie, voltametrie.....	20
1.2.2. Voltametrické metody.....	23
1.2.3. Pracovní elektrody ve voltametrii.....	26
1.2.4. Borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE).....	30
1.2.5. Voltametrické stanovení SMX	31
2. Experimentální část	33
2.3. Přístrojové vybavení	33
2.4. Použité chemikálie	33
2.5. Pracovní postupy.....	34
2.5.1. Voltametrická měření.....	34
2.5.2. Analýza farmaceutického přípravku metodou DPV.....	34
3. Výsledky a diskuse	36
3.1. Studium voltametrického chování sulfamethoxazolu	36
3.1.1. Závislost na pH základního elektrolytu	37
3.1.2. Závislost na rychlosti polarizace	37
3.2. Vývoj metody stanovení SMX	40
3.2.1. Stanovení optimálních podmínek DPV.....	40
3.2.2. Předúprava BDDE	42
3.3. Analýza modelových roztoků SMX.....	44
3.3.1. Koncentrační závislost.....	44
3.3.2. Opakované stanovení SMX v modelových roztocích.....	45
3.4. Analýza farmaceutického přípravku	47
3.4.1. Elektrochemické chování trimethoprimu	47
3.4.2. Analýza směsi sulfamethoxazolu a trimethoprimu.....	48
3.4.3. Analýza přípravku Biseptol.....	53
Závěr	57

Seznam literatury 58

Seznam symbolů a zkratk

A	Amperometrie
AcB	Acetátový pufr
AArGO/SPE	Tištěná elektroda modifikovaná oxidem grafenu redukovaným kyselinou askorbovou
AB	Amoniakální pufr
AdSV	Adsorpční rozpouštěcí voltametrie (Adsorptive stripping voltammetry)
Ag-MWCNT/GCE	Stříbrnými nanočásticemi a uhlíkovými nanotrubičkami modifikovaná elektroda ze skelného uhlíku
ASV	Anodická rozpouštěcí voltametrie (Anodic stripping voltammetry)
BB	Borátový pufr
BDDE	Borem dopovaná diamantová elektroda
c	Koncentrace [mol/l]
CAS	Registrační číslo (Chemistry Abstracts Service)
CeO ₂ /CHIT/GC	Elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná nanokompozitem oxidu ceričitého a chitosanu
CPE	Uhlíková pastová elektroda (Carbon pasta electrode)
CSV	Katodická rozpouštěcí voltametrie (Cathodic stripping voltammetry)
CV	Cyklická voltametrie (Cyclic voltammetry)
D	Difúzní koeficient [m ² /s]
DAD	Detektor s diodovým polem (Diode-Array Detection)
DCV	Stejnoseměrná voltametrie (Direct current voltammetry)
DME	Kapající rtuťová elektroda (Dropping mercury electrode)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DPV	Diferenční pulzní voltametrie (Differential pulse voltammetry)
E	Potenciál [V]
$E^{1/2}$	Půlvlnový potenciál [V]
E_{in}	Počáteční potenciál [V]
E_{obratu}	Potenciál obratu [V]
F	Faradayova konstanta [C/mol]
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier-transform infrared spectroscopy)

GCE	Elektroda ze skelného uhlíku (Glassy carbon electrode)
HDME	Visící rtuťová kapková elektroda (Hanging mercury drop electrode)
I	Proud [A]
I_d	Difúzní proud [A]
I_p	Výška pulzu [A]
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
LDR	Využitelný koncentrační rozsah
LOD	Limitní detekce
LOQ	Mez detekce
m	Hmotnost [kg]
MFE	Rtuťová filmová elektroda (Mercury film electrode)
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry)
MWCN/GCE	Elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná uhlíkovými nanotrubičkami
MWCN/PE	Uhlíková pastová elektroda připravená z uhlíkových nanotrubiček
MWCNT	Vícevrstvé uhlíkové nanotrubičky (Multi-walled carbon nanotubes)
n	Počet vyměněných elektronů
PABA	Para-aminobenzoová kyselina (para-aminobenzoic acid)
PB	Fosfátový pufr
p-DAN	Poly-1,5-diaminonaftalen
p-DAN/GCE	Poly-1,5-diaminonaftalen modifikovaná elektroda ze skelného uhlíku
pKa	Disociační konstanta
RNA	Ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
RSD	Relativní směrodatná odchylka [%]
Sb-MWCNT/parafin	Kompozit antimonových nanočástic s MWCNT a parafinem
SMDE	Statická rtuťová kapková elektroda (Static mercury drop electrode)
SMX	Sulfamethoxazol (sulfamethoxazole)
SV	Rozpouštěcí voltametrie (Stripping voltammetry)
SWV	Voltametrie čtvercových vln (Square Wave Voltammetry)
t	Čas [s]
$t_{1/2}$	Biologický poločas [h]
THMPP	Uhlíková pastová elektroda modifikovaná komplexem [5,10,15,20-

Cu (II)/CPE	tetrakis(3-methoxy-4-hydroxyfenyl)porfyrinato] mědnatým
TMP	Trimethoprim
TYR-Au/SPE	Tištěná uhlíková elektroda modifikovaná nanočásticemi zlata s navázaným enzymem Tyrosináza
UV	Ultrafialové záření
ν	Rychlost polarizace [mV/s]
$\nu^{1/2}$	Druhá odmocnina z rychlosti polarizace [(mV/s) ^{1/2}]
V_d	Distribuční objem [l/kg]
VIS	Viditelná spektroskopie

Úvod

Sulfonamidy patří mezi antibakteriální chemoterapeutika. Mechanismus jejich účinku spočívá v inhibici kyseliny listové. Do této skupiny léčiv patří například sulfamethoxazol, sulfisoxazol, sulfathiazol nebo sulfasalazin. Používají se k léčbě bakteriálních infekcí především močových cest způsobených bakteriemi *Escherichia coli*. Tato léčiva byla postupně vytlačena antibiotiky, ale v posledních letech se společnost k sulfonamidům vrací z důvodu rezistence řady bakterií na antibiotika. Nejrozšířenějším lékem používaným k léčbě močových infekcí je kotrimoxazol. Jedná se o kombinaci dvou léčiv sulfamethoxazolu a trimethoprimu v poměru 5:1.

Stanovení léčiv představuje velmi aktuální problematiku z několika důvodů. Jednak je třeba mít k dispozici jednoduché a rychlé metody pro kontrolu kvality léčiv, tedy obsahu účinných látek ve vyráběných, resp. komerčně dostupných farmaceutických přípravcích. Dále je často třeba monitorovat hladinu léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách a jiných biologických vzorcích. V neposlední řadě je tu také otázka možného znečištění životního prostředí léčiv, která je zejména v posledních letech hodně diskutovaná v souvislosti s nadužíváním léčiv a jejich nesprávnou likvidací. Nejčastěji používanou metodou pro stanovení těchto látek ve všech druzích vzorků je metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie v kombinaci s různými detekčními systémy. Tato metoda je ale finančně, instrumentálně i časově velmi náročná. Jako velmi vhodná alternativa se nabízí voltametrie, jejíž hlavní výhody spočívají v jednoduchosti, rychlosti, nízké pořizovací ceně a vysoké citlivosti. Důležitá je rovněž možnost miniaturizace a použití v přenosných analyzátoch. Voltametrie se postupem času vyvinula z polarografie, kterou v roce 1922 objevil český vědec Jaroslav Heyrovský. Za tento objev získal Nobelovu cenu za chemii v roce 1959.

Předmětem této bakalářské práce je studium voltametrického chování sulfonamidového léčiva sulfamethoxazolu. Cílem byl vývoj voltametrické metody jeho stanovení využitelné při analýze praktických vzorků komerčně dostupných farmaceutických přípravků. Vzhledem k tomu, že se v lécích obvykle vyskytuje ve směsi s trimethoprimem, pozornost byla věnována i této látce.

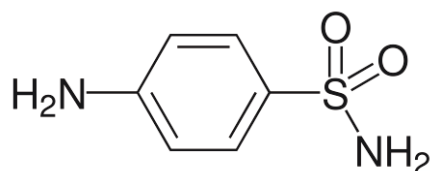
1. Teoretická část

1.1. Sulfamethoxazol

Sulfamethoxazol je sulfonamidové bakteriostatické léčivo, které blokuje přeměnu kyseliny p-aminobenzoové, která je pro bakterie nepostradatelná k syntéze kyseliny listové. Používá se k léčbě močových cest. Je vhodný při léčbě pacientů s bakteriální infekcí způsobenou např. bakteriemi *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Haemophilus influenza* a orálních anaerobů. Sulfamethoxazol má tedy řadu využití, a to i jako alternativa amoxicilinu k léčbě sinusitidy (zánětlivé onemocnění vedlejších dutin dýchacích cest) [1].

1.1.1. Sulfonamidová léčiva

Sulfonamidová léčiva jsou odvozena od sulfanilamidu (sulfonamidu), jehož strukturní vzorec je uvedený na obrázku 1 [2]. Sulfanilamid patří mezi vůbec první sulfonamidy a byl vyvinut v roce 1906. Sulfonamidy se řadí do skupiny syntetických léčivých přípravků a často jsou nazývány jako sulfa léky. Pod termínem sulfonamid se většinou vybaví označení antibiotikum, ale do této skupiny se řadí i několik neantibiotik (např.: dapson, sumatriptan atd.), které se používají např. k léčbě cukrovky nebo pro úlevu od bolesti [3].



Obrázek 1 Strukturní vzorec sulfanilamidu (sulfonamidu)

Mechanismus účinku sulfonamidových léčiv spočívá v inhibici metabolismu bakteriální buňky. Sulfonamidy jsou svojí strukturou velice podobné kyselině p-aminobenzoové (PABA), se kterou soutěží o enzym dihydropteroátsyntetázu. Sulfonamidy zabraňují syntéze bakteriálního růstového faktoru kyseliny listové a tím dochází ke vzniku nefunkčních analog kyseliny listové [1]. Kyselina listová v bakteriích je velmi důležitá pro tvorbu nukleových kyselin i DNA a RNA. Na rozdíl od lidí si ji bakterie musí syntetizovat [4]. Přebytek PABA může způsobit vytěsnění sulfonamidu a bakteriostatický účinek se naruší. Sulfonamidy se

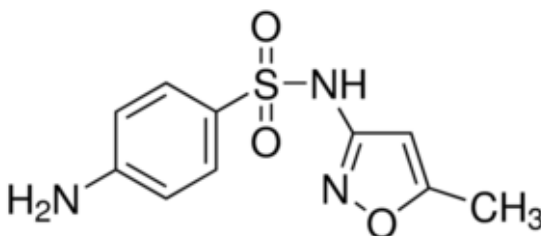
využívají pouze na bakterie, které si svou kyselinu listovou syntetizují, pro ostatní jsou neúčinné [1].

Mezi časté nežádoucí účinky sulfonamidů patří gastrointestinální potíže (průjem, nevolnost, zvracení), závrať, kandidóza (přemnožení kvasinky *Candida*), únava, bolest hlavy, vyrážka, svědící pokožka a nedostatek folátů [3]. Užívání sulfonamidů je zakázáno těhotným a kojícím ženám. Podávají se perorálně s relativně vysokou biologickou dostupností okolo 70 %. Vylučují se ledvinami [1].

Sulfonamidy lze léčit řadu stavů, vedle již zmíněné bakteriální infekce močových cest, jde také o diabetes, dnu, zadržování tekutin, revmatoidní artritidu, vysoký krevní tlak, ulcerózní kolitidu, bolest a zánět [3]. Léčba sulfonamidy je cílená na mikroorganismy, mezi které patří streptokoky, hemofily, chlamydie, *Toxoplasma gondii*, *Actinomyces spp.*, *Nocardia spp.* a *Neisseria meningitidis* [1]. Z původně velmi rozsáhlé skupiny sulfonamidů, která se v průběhu let zužovala, se v dnešní době využívá jen pár léčiv. Mezi nejpoužívanější antibiotická léčiva patří např. sulfisoxazol, sulfathiazol, sulfasalazin a sulfamethoxazol [1]. Nejčastěji se používá kombinace trimethoprimu se sulfamethoxazolem, která se nazývá co-trimoxazol.

1.1.2. Sulfamethoxazol

Sulfamethoxazol (SMX) patří do skupiny sulfonamidových léčiv a jeho strukturní vzorec je uveden na obrázku 2. Nejvíce je využíván při léčbě onemocnění způsobených bakteriemi, především infekcí močového měchýře. Další jeho využití je při malárii, otitis media (akutní zánět středního ucha), trachomu a toxoplazmóze [4].



Obrázek 2 Strukturní vzorec sulfamethoxazolu [2]

Poprvé byl SMX patentován v roce 1959 Japonci [5]. Výroba začala v roce 1961 pod názvem Gantanol[®] společností Roche sídlící v USA. V současné době je znám pod obchodními názvy

Bactrim™ a Septra®. Výchozími surovinami pro výrobu SMX jsou hydroxid sodný, acetylsulfanylchlorid a ethyl-5-methylisoxazol-3-karbamat [6]. SMX je bílý až žlutobílý prášek bez zápachu, hořké chuti, který je stabilní na vzduchu. Zahřátím se z něj uvolňují toxické výpary sulfoxidů a nitridů. Stručný přehled základních informací o SMX je shrnut v tabulce I [7].

Tabulka I Základní vlastnosti SMX [7]

IUPAC název	4-amino-N-(5-methyl-1,2-oxazol-3-yl)benzensulfonamid
Sumární vzorec	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S
CAS	723-46-6
Molekulová hmotnost	253,28 g/mol
Bod tání	167 °C
Disociační konstanty	pKa1 - 1,6 pKa2 - 5,7

SMX se nejčastěji používá v kombinaci s trimethoprimem (TMP) v poměru 5:1. Tato směs se nazývá kortimoxazol nebo co-trimoxazol (TMP-SMX) [1]. TMP-SMX působí na řadu patogenů jako je *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii* a druhy *Enterobacter* [8]. Účinek této kombinace léčiv spočívá v synergetické inhibici dvou po sobě jdoucích stupňů syntézy kyseliny listové, působí na řadu gram pozitivních a gram negativních mikrobů a také snižuje vznik rezistentních kmenů [1]. SMX má důležitou roli v inhibici dihydropteroátu syntetázy a kyseliny p-aminobenzoové, u které blokuje včlenění do kyseliny dihydrofolové (derivát kyseliny listové). TMP pro změnu váže dihydrofolát reduktázu a zabraňuje přeměně kyseliny dihydrofolové na kyselinu tetrahydrofolovou [8].

Farmakokinetika SMX spočívá v úplném vstřebání a dosažení maximální koncentrace v krvi do dvou hodin od perorálního podání. Váže se na plazmatické bílkoviny asi z 65 %. Vylučuje se močí, glomerulární filtrací i tubulární sekrecí do 48 hodin. Při normální funkci ledvin je biologický poločas eliminace 10-15 hodin, při chronickém onemocnění ledvin i 50 hodin [1]. TMP dosahuje maximální koncentrace v krvi po perorálním podání během 1-4 hodin a téměř úplně se vstřebává. Na plazmatické bílkoviny se váže ze 40-70 %, dobře proniká do tkání ledvin, plic a tekutin. TMP se z 20 % metabolizuje primárně v játrech, vylučuje se močí a

stolicí (4 %). Biologický poločas při normální funkci ledvin činí 8-15 hodin, při chronickém onemocnění ledvin 24 hodin [1]. Hodnoty farmakokinetických údajů jsou uvedeny v tabulce II. TMP-SMX snadno prochází placentární bariérou do mléka kojících matek. Hemodialýza odstraní významné množství TMP-SMX [1].

Tabulka II Farmakokinetické vlastnosti TMP-SMX [1]

	Vazba na bílkoviny (%)	Distribuční objem V_d [l/kg]	Frakce vyloučená do moči [%/24 h]	Biologický poločas $t_{1/2}$ [h]
trimethoprim	45	1,2	20-40	11,0
sulfamethoxazol	68	0,21	14	10,1

TMP-SMX inhibuje enzym CYP2C9 cytochromu P450, čímž zvyšuje hladiny některých léků, které jsou tímto enzymem inhibovány. Mezi závažné patří interakce TMP-SMX s fenytoinem a warfarinem. Závažnější následky budou u pacientů užívajících fenytoin, u kterých se projeví kromě zvýšené hladiny i toxicita (ataxie, ztráta rovnováhy) po zahájení léčby TMP-SMX. U pacientů užívající warfarin se kromě zvýšené hladiny projeví i krvácivé příhody [9]. Mezi nežádoucí účinky patří gastrointestinální obtíže (nauzea, zvracení), závratě, bolesti hlavy, kožní alergické reakce a změny krevního obrazu [1]. Mezi vážné nežádoucí účinky patří Stevens-Johnsonův syndrom (imunopatologická reakce v kůži, při níž dochází k edému, nekróze epidermis a zánětlivé infiltraci cév) nebo krevní dyskrázie, zejm. útlum kostní dřeně (stavy, při nichž jsou kmenové krvetvorné buňky poškozeny a přestávají dostatečně plnit svoji funkci) [9-11].

Kombinace TMP-SMX se doporučuje používat při léčbě *Pneumocystis Jiroveci* pneumonie, toxoplazmózy, chronické bronchitidy a infekcích močových cest [9].

1.1.3. Možnosti stanovení sulfamethoxazolu

V odborné literatuře lze najít různé metody pro stanovení SMX. Často je zmiňováno spektrofotometrické stanovení [12]. Tomu obvykle předchází extrakce analytu [13] nebo komplexace např. s kyselinou chloranilovou [14] nebo beta-cyklodextrinem [15]. V práci [16] je popsán postup spektrofotometrického stanovení sulfonamidových léčiv po reakci s 7,7,8,8-tetrakyanochinondimetanem, 2,3-dichloro-5,6-dikýano-1,4-benzochinone, a 2,5-dichloro-3,6-

dihydroxy-1,4-benzochinonem, kdy vznikají barevné produkty absorbující záření ve viditelné oblasti. Spektrofotometrie v ultrafialové (UV) a viditelné (VIS) oblasti byla aplikována jak pro stanovení SMX ve farmaceutických přípravcích [13, 14, 17] tak v odpadních vodách [18] a lze ji rovněž využít pro simultánní stanovení SMX a TMP [14, 17, 18]. Další možností je využití infračervené (FTIR) spektroskopie [19, 20] nebo fluorescenční spektroskopie, např. po fotochemické indukci fluorescence UV zářením [21]. V práci [22] je popsáno stanovení SMX pomocí Ramanovy spektroskopie.

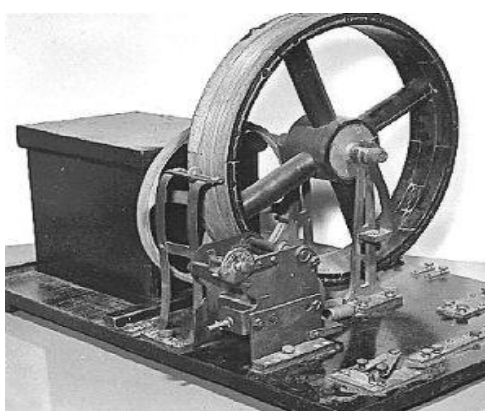
Řada odborných článků se věnuje rovněž stanovení SMX, resp. sulfonamidů, s využitím chromatografických metod. Nejčastěji se používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s různými detektory, např. s detektorem s diodovým polem (DAD) [23, 24], UV [25-27] nebo fluorescenčním detektorem [28, 29] a hmotnostním (MS) [30] detektorem. Tyto metody umožňují stanovení SMX a TMP vedle sebe [24, 27, 31] nebo i simultánní stanovení řady sulfonamidových léčiv [25, 26, 29, 30]. Byly aplikovány při analýze léků [27], potravinových [24, 28-30, 32] i biologických [31] vzorků. Nevýhodou těchto metod je obvykle nutnost složitější přípravy vzorku k analýze, například potřeba izolace analytu z matrice s využitím extrakčních technik [26, 31]. Často používanou metodou úpravy vzorku je derivatizace [26, 29], tedy převedení analytu chemickou reakcí na produkt, jenž může být následně stanoven. Příkladem pro stanovení SMX a sulfonamidů obecně může být využití diazotace a kopulace, a tedy vznik azobarviv [31].

Z dalších analytických metod byly pro stanovení SMX využity i kapilární zónová elektroforéza [33] a potenciometrie [34], ale v mnohem menší míře.

Uvedené metody představují citlivý a selektivní nástroje pro stanovení SMX, ovšem obvykle vyžadují náročnou a drahou instrumentaci, komplikovanou úpravu vzorku před analýzou a mohou tedy být časově náročné. Vhodnou alternativou mohou být voltametrické metody, jež jsou citlivé, jednoduché, rychlé a obvykle i méně náročné na vybavení i přípravu vzorku. Teorii voltametrie a jejímu využití pro stanovení SMX jsou věnovány následující kapitoly.

1.2. Voltametrie

V roce 1922 publikoval Jaroslav Heyrovský objev využití elektrolýzy s rtuťovou elektrodou [35]. V té době ještě nikdo netušil o jak významnou kapitolu v moderní analytické chemii se bude jednat. O dva roky později sestrojil se svým žákem M. Shikatou přístroj zvaný polarograf (obrázek 3). Jedná se o přístroj, který při elektrolýze roztoku vzorku zaznamenává křivky proudu v závislosti na napětí. Tento vynález zkrátil postupy měření z několika hodin na minuty [36]. Profesor Heyrovský získal v roce 1959 za metodu polarografické analýzy Nobelovu cenu za chemii.



Obrázek 3 Model polarografu (1924) [36]

V tomto období se polarografie stala velmi oblíbenou metodou v instrumentální analytické chemii. Ve 40. a 50. letech 20. století se polarografie široce používala ke stanovení anorganických i organických látek. Úpadek klasické polarografie nastal v šedesátých letech, neboť vznikaly nové spektrometrické a chromatografické metody, které byly citlivější a selektivnější vzhledem k vzrůstajícím požadavkům v praxi. Sedmdesátá a osmdesátá léta přinesla renesanci v polarografické analýze. Vzniklo mnoho prací, které využívaly polarografické a voltametrické metody. Klasická rtuťová kapající elektroda byla nahrazena statickou či visící rtuťovou kapkovou elektrodou, a i klasická polarografie byla nahrazena modernějšími variantami voltametrických metod. Jednalo se o normální a diferenčně pulzní voltametrii nebo anodickou, resp. adsorpční rozpouštěcí voltametrii s využitím ve stopové analýze [37].

1.2.1. Úvod do polarografie, voltametrie

Voltametrická, resp. polarografická měření zahrnují aplikaci potenciálu (E) na elektrodu a následné monitorování proudu (I) protékajícího elektrochemickým článkem. Vkládaný potenciál se mění v závislosti na čase [38]. Metoda, která používá kapající rtuťovou elektrodu (DME) jako indikační v elektrochemickém provedení článku se nazývá polarografie [39]. Název je odvozen od polarizované elektrody tzn. že jí neprochází žádný proud. Voltametrické metody se vyvinuly z polarografie a pracují se stacionárními indikačními elektrodami, které mohou být jak rtuťové (např. visící rtuťová kapková elektroda nebo rtuťové filmové elektrody), tak z pevných materiálů (např. kovové nebo uhlíkové) [38].

Celkový proud při polarografických, resp. voltametrických metodách je určen i dalšími proudy, které se nazývají podle příčiny jejich vzniku. Patří sem:

- *difúzní (faradický) proud* – je limitován rychlostí difúze elektroaktivních částic. Proud je přímo úměrný koncentraci elektroaktivní látky, závisí na teplotě a není závislý na koncentraci základního elektrolytu [40];
- *nabíjecí (kapacitní) proud* – odpovídá nabíjení elektrické dvojvrstvy na rozhraní elektrody a roztoku a závisí na složení a koncentraci základního elektrolytu. V případě kapající rtuťové elektrody je přímo úměrný výšce rtuťového zásobníku. Velikost tohoto proudu řádově odpovídá koncentraci analytu v roztoku 10^{-5} mol/l a je srovnatelný s faradickým proudem. Nepříznivý vliv tohoto proudu lze snížit použitím elektronicky řízené SMDE, technikou vzorkování proudu nebo nestacionární pulzní technikou (např. DPP nebo DPV) [40];
- *kinetický proud* – vytváří se v blízkosti elektrody během chemické reakce. Limitní proud v kinetických proudech je určen rychlostí chemické reakce. Pro hodnocení kinetických účinků je vhodná metoda cyklické voltametrie [39]. Kinetický proud je závislý na pH základního elektrolytu a často také na teplotě [40];
- *katalytický proud* – vzniká, pokud je v roztoku depolarizátoru přítomný katalyzátor [40]. Proud závisí na koncentraci katalyzátoru, teplotě, složení roztoku, iontové síle a rychlostní konstantě [39, 40];
- *adsorpční proud* – vzniká, pokud je analyt absorbován na pracovní elektrodě v původní formě nebo po elektrochemické či chemické konverzi [39, 40].

Okamžitý proud lze vypočítat z Ilkovičovy rovnice (1) pro kapající rtuťovou elektrodu:

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

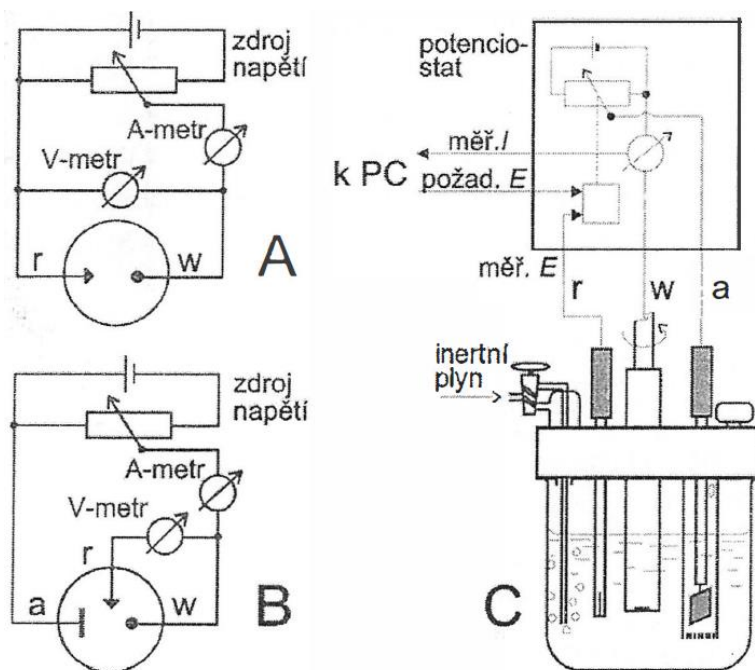
kdy I je difúzní proud, n je počet vyměněných elektronů, F je Faradayova konstanta, D je difúzní koeficient, m je hmotnost Hg kapky, t je doba kapky a c je koncentrace látky.

Pro střední proud odvodil Ilkovič rovnici (2) ve tvaru [40]:

$$I = 0,627 \cdot n \cdot F \cdot D^{1/2} \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6} \cdot c \quad (2)$$

1.2.1.1 Uspořádání elektrochemického článku

Základní prvky tvořící moderní elektroanalytický systém jsou potenciostat, počítač a elektrochemický článek [38]. Dřívější metody využívaly pouze dvě elektrody, pracovní a referentní (srovnávací) elektrodu. Dvouelektrodové uspořádání obsahuje pracovní elektrodu ponořenou do analyzovaného roztoku a referentní elektrodu spojenou s analyzovaným roztokem pomocí solného můstku. Schéma zapojení je uvedeno na obrázku 4A. Tato varianta je vhodná pro mikroelektrody s nízkým odporem. Nevýhoda tohoto uspořádání je v tom, že není přesně znám potenciál pracovní elektrody, protože se při průchodu proudu část vložného napětí ztratí na odporu roztoku, který je analyzován [40].



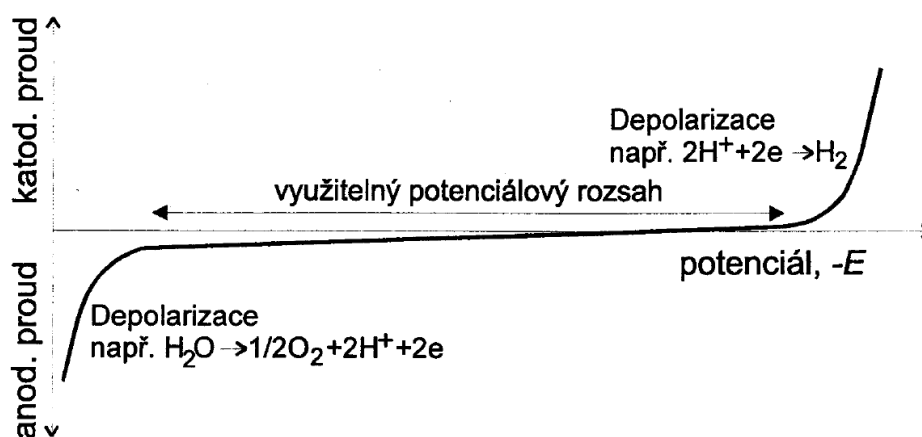
Obrázek 4 Uspořádání elektrochemického článku pro dvouelektrodové (A) a tříelektrodové (B) zapojení obvodu, realizace zapojení tříelektrodového článku (C), a – pomocná elektroda, r – referentní elektroda, w – pracovní elektroda [40]

Modernější tříelektrodové uspořádání obsahuje navíc pomocnou elektrodu (obrázek 4B, C). Mezi pomocnou a pracovní elektrodou prochází proud. Mezi pracovní a referentní elektrodou se měří skutečný potenciál pracovní elektrody v bezproudém stavu. Jako zdroj napětí se využívá potenciostat, který udržuje potenciál pracovní elektrody na požadované hodnotě. Počítač s vhodným softwarem řídí měření proudu a časový průběh potenciálu [40].

Pracovní polarizovatelná elektroda může být z pevného materiálu (zlato, stříbro, platina, uhlík) nebo rtuti. Pomocnou elektrodu nejčastěji tvoří platinový drátek [41]. Pomocné elektrody mají podstatně větší povrch ve srovnání s pracovními elektrodami a jsou nepolarizovatelné. Obvykle bývá pomocná elektroda od analyzovaného roztoku oddělena skleněnou fritou, aby nedošlo ke kontaminaci roztoku případnými produkty reakcí, které na ní probíhají. Jako referentní elektroda se používá nejčastěji argentchloridová nebo kalomelová elektroda, které patří mezi elektrody II. druhu. Referentní elektroda je rovněž nepolarizovatelná, má konstantní potenciál [42].

1.2.1.2 Polarizační křivka

Polarizační křivka je výstupem polarografických, resp. voltametrických měření a představuje závislost proudu, který protéká pracovní elektrodou na jejím potenciálu [42]. Schéma polarizační křivky získané v roztoku základního elektrolytu je uvedeno na obrázku 5.



Obrázek 5 Polarizační křivka zaznamenaná v základním elektrolytu [42]

Při volbě základního elektrolytu je třeba dbát na to, aby obsahoval pouze látky, které se oxidují nebo redukují na pracovní elektrodě při vysokých hodnotách potenciálů. Elektroda je

tak polarizovaná v široké oblasti potenciálů a protéká jí malý nabíjecí proud. Pro voltametrickou analýzu je využitelný rozsah potenciálů, v rámci něhož je elektroda v základním elektrolytu zpolarizovaná. Toto tzv. pracovní okno elektrody závisí na materiálu pracovní elektrody, základním elektrolytu a použitém rozpouštědle [42].

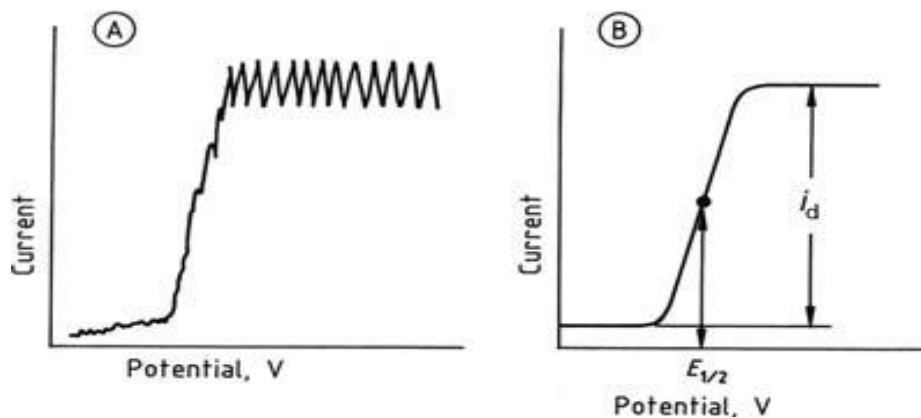
Pokud se na pracovní elektrodě oxiduje analyt, je elektroda anodou. Při redukci analytu na pracovní elektrodě je tato katodou. Elektrochemické reakce, které probíhají při průchodu proudem na pomocné elektrodě, se nesledují. Bývá to oxidace vody nebo redukce vodíkového iontu. Proud spojený s elektrochemickou přeměnou analytu se nazývá faradický proud. Pokud faradický proud odpovídá redukci analytu, má záporné znaménko a jedná se o katodický proud. Naopak anodický proud odpovídá oxidaci na pracovní elektrodě a má kladné znaménko. Velikost proudové odezvy je přímo úměrná koncentraci analytu v analyzovaném vzorku [41].

1.2.2. Voltametrické metody

V minulosti byla postupně vyvinuta řada voltametrických metod, které se liší zejména průběhem potenciálu v závislosti na čase, který se vkládá na pracovní elektrodu. Následující kapitoly budou věnovány zejména metodám, které byly v rámci experimentální části využity v této práci.

1.2.2.1 Stejnosměrná voltametrie

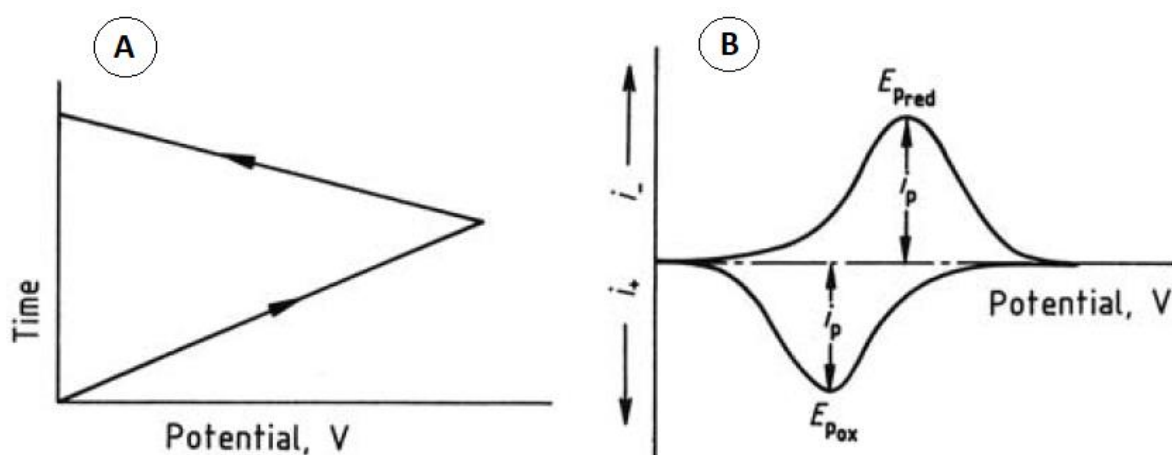
Stejnosměrná voltametrie (direct current voltammetry, DCV) zaznamenává proud, který protéká článkem obsahujícím analyt a elektrolyt, přičemž potenciál pracovní elektrody se lineárně mění s časem, roste nebo klesá [39, 42]. Tvar získané polarografické, resp. voltametrické křivky je uveden na obrázku 6A a B. Oscilace na křivce na obrázku A jsou způsobeny rostoucí velikostí kapky v průběhu analýzy při použití DME jako pracovní elektrody. Voltametrickou křivku charakterizují veličiny difuzní proud (I_d) a půlvlnový potenciál $E_{1/2}$. Půlvlnový potenciál je kvalitativním údajem a difuzní proud kvantitativním. Při stanovení několika analytů současně se musí půlvlnové potenciály lišit o 100 mV, aby bylo možné látky od sebe odlišit. Metodou DCV lze analyzovat anorganické a organické analyty s mezemi stanovitelnosti kolem 10^{-5} mol/l [39].



Obrázek 6 DCV polarografická (A) a voltamtrická (B) křivka [39]

1.2.2.2 Cyklická voltametrie

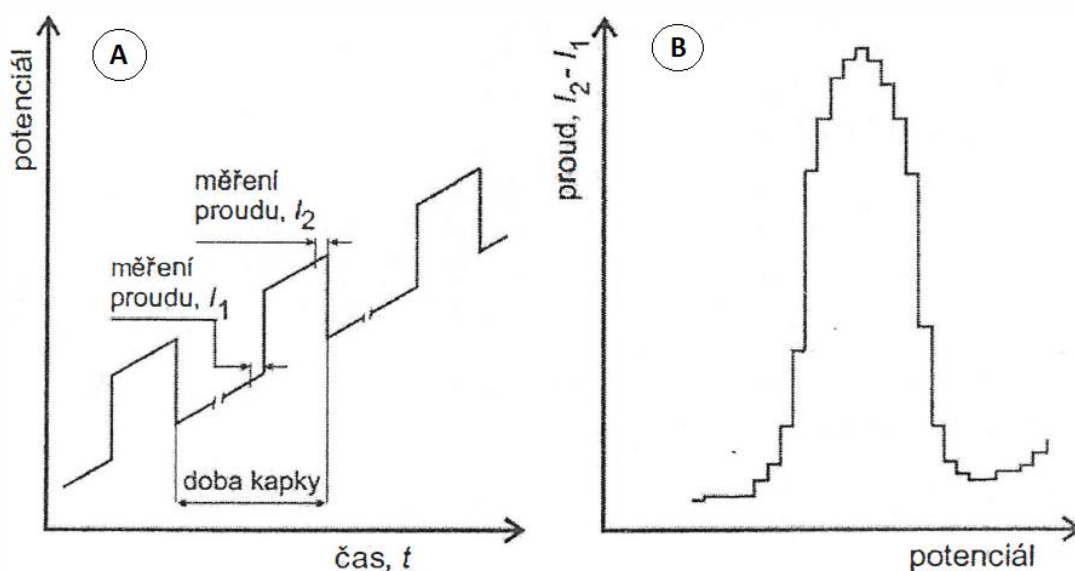
Cyklická voltametrie (cyclic voltammetry, CV) je metoda, při které se na elektrodu vkládá napětí trojúhelníkového průběhu. Nejprve lineárně roste (klesá) a poté se průběh obrátí a napětí opět klesá (roste) k počáteční hodnotě. Sleduje se tedy nejprve redukce látky a po obrácení potenciálu případná oxidace ať už analytu nebo jeho redukčních produktů, nebo naopak nejprve oxidace a při zpětném skenu redukce. Průběh potenciálu při CV je znázorněn na obrázku 7 spolu s příkladem výsledného cyklického voltamogramu. CV se používá pro studium redoxních dějů, reversibility systémů nebo posouzení stability produktů redoxních reakcí. Velmi málo se používá pro kvantitativní stanovení látek [38].



Obrázek 7 Průběh potenciálu při CV (A) a výsledný cyklický voltamogram (B) [39]

1.2.2.3 Diferenční pulzní voltametrie

Diferenční pulzní voltametrie (differential pulse voltammetry, DPV) je technika, při které se na elektrodu vkládá lineárně rostoucí nebo klesající potenciál, který se překládá konstantními napěťovými pulzy. Průběh vkládaného potenciálu je znázorněn na obrázku 8A. Proud se měří těsně před aplikací a na konci pulzu a rozdíl těchto hodnot se vynáší v závislosti na potenciálu [38]. Křivka má tvar píku (obrázek 8B) a jeho výška je závislá na koncentraci analytu. Tato metoda je vhodná pro stanovení nižší koncentrace látek odpovídající 10^{-8} mol/l. Metoda je vhodná pro stanovení látek, které mají podobný půlvlnový potenciál. Rozdíl $E_{1/2}$ dvou látek stanovovaných vedle sebe musí být větší než 50 mV [42].

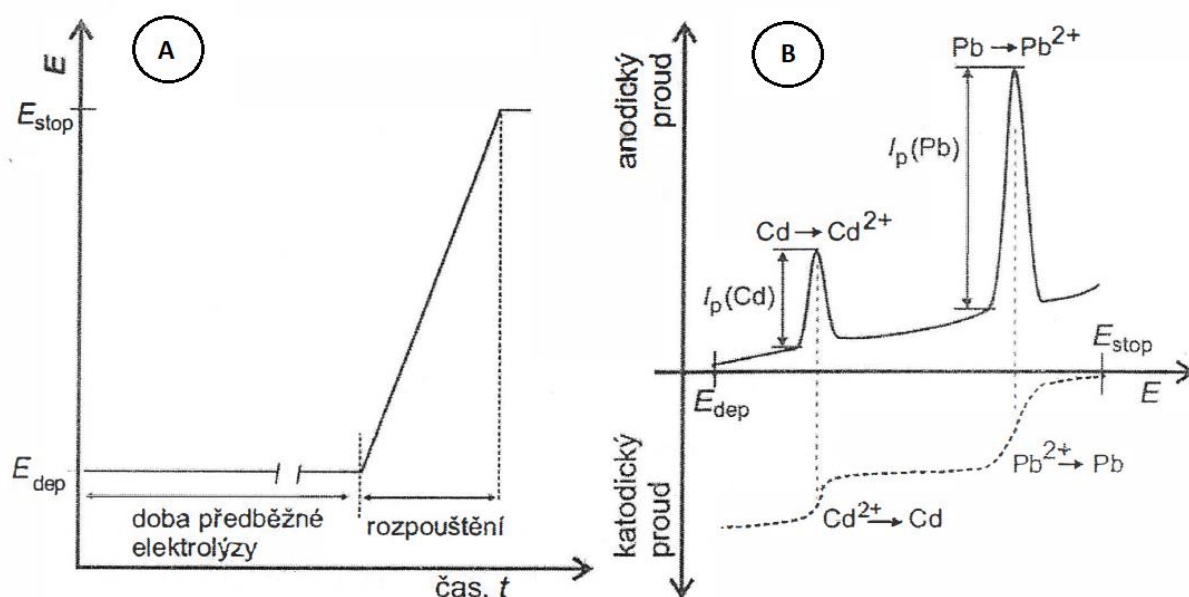


Obrázek 8 Průběh potenciálu (A) a výsledná proudová odezva (B) při DPV [40]

1.2.2.4 Rozpouštěcí metody

Rozpouštěcí voltametrie (stripping voltammetry, SV) zahrnuje tři metody, konkrétně anodickou rozpouštěcí voltametrii (anodic stripping voltammetry, ASV), katodickou rozpouštěcí voltametrii (cathodic stripping voltammetry, CSV) a adsorpční rozpouštěcí voltametrii (adsorptive stripping voltammetry, AdSV). ASV patří mezi nejrozšířenější voltametrické metody v praxi [41]. Všechny tyto metody mají společné dva kroky. V prvním kroku se látka při konstantní hodnotě vkládaného potenciálu ze vzorku koncentruje na nebo do pracovní elektrody. V průběhu druhého kroku se měří proudová odezva analytu při jeho

rozpuštění zpět do roztoku [38]. SV se používá např. pro stanovení stopových koncentrací těžkých kovů na rtuťové elektrodě, kde se využívá tvorby amalgámů [42]. Průběh potenciálu v závislosti na čase a výsledný voltamogram při stanovení kadmia a olova ve vzorku metodou ASV jsou uvedeny na obrázku 9. CSV se používá ke stanovení látek, které tvoří nerozpustné soli s Hg^{2+} . AdSV je založena na adsorpci analytu na povrchu elektrody a využívá se zejména při analýze organických látek [38, 41].



Obrázek 9 Průběh potenciálu (A) a výsledná proudová odezva (B) při stanovení kadmia a olova metodou ASV [40]

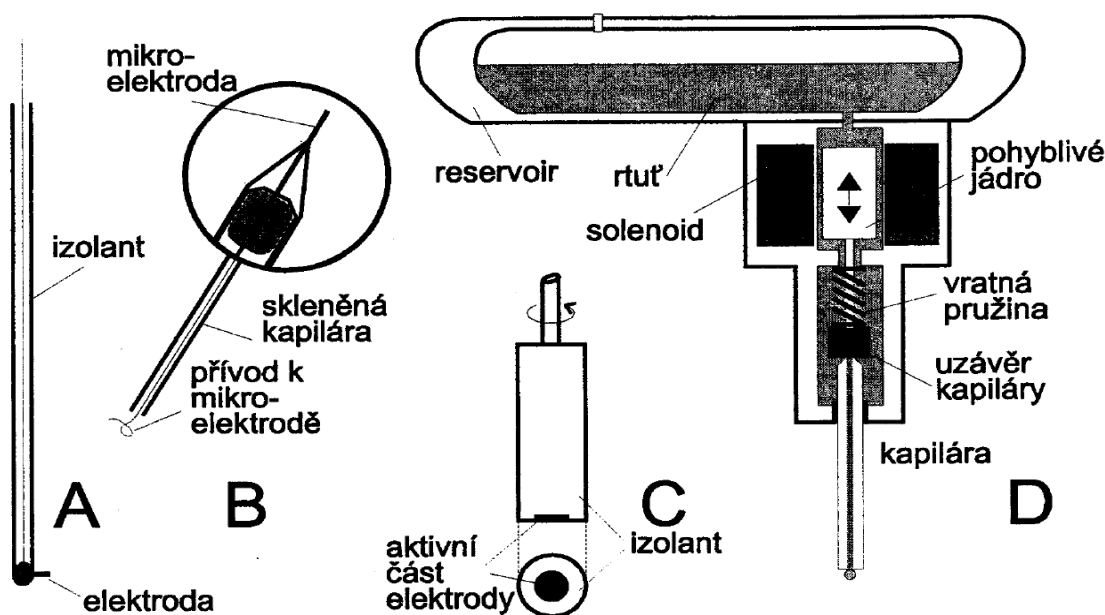
1.2.3. Pracovní elektrody ve voltametrii

Pracovní elektroda je elektroda s malým pracovním povrchem používaná k monitorování reakce analytu. Malá aktivní plocha zajišťuje, že se na povrchu elektrody vytvoří vysoká hustota proudu. Pracovní elektrody se vyrábí z rozsáhlé škály vodivých materiálů [39]. Nejčastěji ze rtuti, zlata, stříbra, platiny nebo uhlíku [41]. Obvykle jsou elektrody pojmenovány po materiálu, z něhož jsou vyrobeny [39]. Mohou mít různý tvar (obrázek 10) a používají se v klidném nebo míchaném roztoku, některé mohou rotovat nebo vibrovat [42].

1.2.3.1 Rtuťové elektrody

Rtuť patří od začátků polarografie mezi základní materiály elektrod. Má relativně široký rozsah potenciálu využitelný pro voltametrické stanovení různých látek [42], a to zejména v katodické oblasti. Vhodná je tedy zejména pro sledování redukčních reakcí. Rtuť je často zavěšená jako kapka na konci kapilární trubice.

Mezi výhody rtuti patří hlavně vysoké přepětí vodíku a schopnost rozpouštět kovy, což vede k tvorbě amalgamu [41]. Použitím kapilární elektrody s kapkou rtuti se dá velmi snadno a reprodukovatelně obnovit povrch elektrody, čímž jsou eliminovány problémy s pasivací. Rtuťová kapka je dokonale hladká, její geometrický povrch odpovídá skutečnému [39]. Naopak nevýhodou může být rozpouštění rtuti při relativně nízkých hodnotách pozitivního potenciálu, takže rtuťové elektrody nejsou příliš vhodné pro sledování oxidačních reakcí. Nejsou použitelné v oblasti pozitivních potenciálů.



Obrázek 10 Drátková elektroda (A), vláknová elektroda (B), rotující disková elektroda (C), elektronicky řízená rtuťová kapková elektroda (D) [42]

Existuje několik variant rtuťových elektrod:

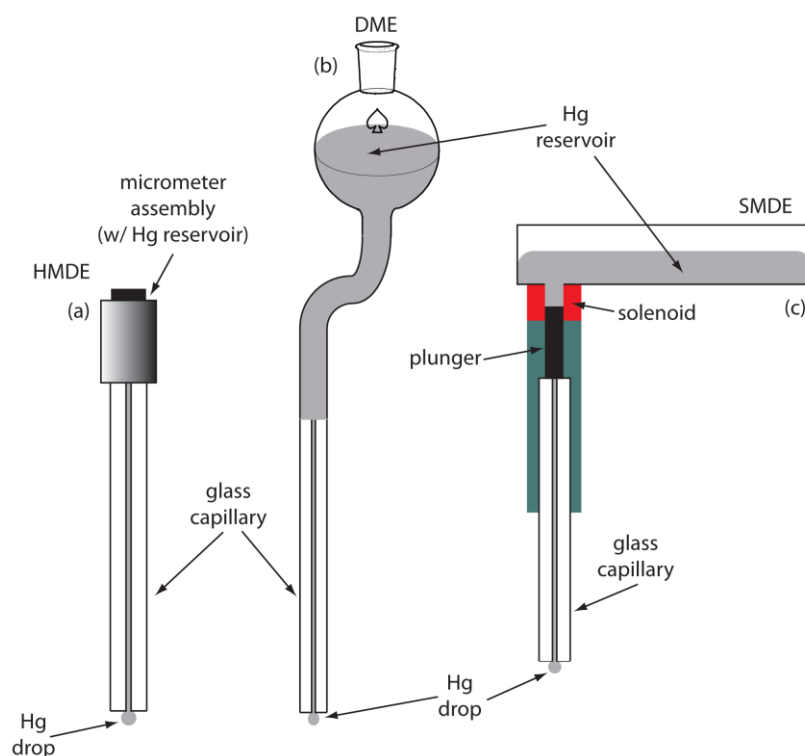
- *Kapající rtuťová elektroda* (dropping mercury electrode, DME, obrázek 11B) se skládá ze skleněné kapiláry dlouhé 10-20 cm s vnitřním průměrem 0,04-0,01 mm

připojené trubicí k zásobní nádobě rtuti. Vlivem gravitace se tvoří na konci kapilární trubice kapka rtuti. Kapka má životnost několik sekund, následně je kapka uvolněna a nahrazena novou [41].

- *Visící rtuťová kapková elektroda* (hanging mercury drop electrode, HDME, obrázek 11A) je opět tvořena skleněnou kapilárou s malým zásobníkem rtuti. Kapka rtuti se vytlačuje ze zásobníku kapilární trubicí otočením mikrometrického šroubu [41]. Povrch Hg není v průběhu měření obnovován. Před další analýzou se odklepe a vytvoří se nová kapka. Mezi výhody patří menší spotřeba rtuti a menší nabíjecí proud [40].
- *Statická rtuťová kapková elektroda* (static mercury drop electrode, SMDE, obrázek 11C) používá elektromagneticky poháněný píst k ovládní toku rtuti. Aktivace solenoidu zvedne píst a nechá rtuť téct kapilárou za vzniku visící kapky Hg. Opakující se aktivace solenoidu produkuje řadu kapek [41]. Na rozdíl od DME lze kapky obnovovat řízeně v konkrétních časových intervalech. Největší výhodou SMDE je schopnost fungovat jako stacionární i nestacionární rtuťová elektroda.
- *Rtuťová filmová elektroda* (mercury film electrode, MFE) se používá pro stopovou rozpouštěcí analýzu [39]. Elektroda je obvykle tvořena pevným substrátem z uhlíku, platiny nebo zlata a na jejím povrchu je elektrolyticky vyloučen film rtuti z roztoku rtuťnaté soli při vhodném potenciálu [41]. Nejčastěji se jako substrát používá skelný uhlík [39]. Voltametrická stanovení mohou být citlivější než s využitím HDME [39].

1.2.3.2 Pevné elektrody

Pevné elektrody jsou obvykle zhotovené z platiny, stříbra, zlata nebo uhlíku. Lze je využít k měření jak v oblasti pozitivních, tak negativních potenciálů. Obvykle jsou využívány spíše při stanovení látek na základě jejich oxidace, protože umožňují měření při značně pozitivních potenciálech na rozdíl od rtuťových elektrod. Naopak v oblasti negativních potenciálů vykazují často nižší přepětí vodíku než rtuť a jsou tedy méně vhodné. Pevná elektroda má obvykle konstantní tvar. Výjimku tvoří uhlíková pastová elektroda, která se vyrábí naplněním dutiny na konci inertního nosiče pastou připravenou z uhlíkových částic a oleje. Její povrch tak může být obnovován podobně, jako povrch rtuťových kapkových elektrod vytlačěním a otřením použité pasty filtračním papírem [41]. Velkou nevýhodou pevných elektrod jsou právě omezené možnosti regenerace povrchu a s tím spojené riziko pasivace.



Obrázek 11 Rtuťové elektrody: a) HDME, b) DME, c) SMDE [41]

Uhlíkové a grafitové elektrody se nejčastěji používají v rozsahu anodických potenciálů. Mezi nejvíce používané elektrody patří *elektroda ze skelného uhlíku* (GCE) a *uhlíková pastová elektroda* (CPE), které se používají jako stacionární nebo rotující elektrody. GCE se skládá z kolíků nebo tyčí, které jsou vlepené nebo vlisované do skleněného nebo plastového držáku. CPE je tvořena směsí spektroskopicky čistého uhlíkového nebo grafitového prášku a ve vodě viskózních, nerozpustných organických kapalin (nujol, deriváty naftalenu, silikonový olej). Tato směs je natlačena ve skleněném nebo teflonovém elektrodovém těle a vytlačuje se z tuby pístem [39].

Elektrody z ušlechtilého kovu se využívají pro stanovení prvků, které nelze stanovit s využitím Hg elektrod, příkladem je stanovení Hg na Au elektrodě. Pro voltametrickou analýzu mají druhotný význam [39]. V praxi tyto elektrody vyžadují častou rekondici, což je způsobeno vlivem roztoku nebo tvorbou oxidové vrstvy na povrchu elektrody. Rekondice (regenerace) se provádí buď použitím vhodného potenciálu nebo leštěním [41].

1.2.3.3 Modifikované elektrody

Pod pojmem modifikovaná elektroda se rozumí povrch pracovní elektrody, který byl chemicky pozměněn nebo zpracován za účelem změny vlastností, nejčastěji zlepšení její selektivity nebo citlivosti. K úpravě, modifikaci, povrchu se používá činidlo, které se nazývá modifikátor. Ten může např. zlepšit selektivitu elektrody tím, že bude vázat analyt na povrch elektrody. Modifikaci povrchu lze provádět vyloučením kovových nanočástic na povrchu elektrody, používají se různé uhlíkové nanočástice/nanotrubičky pro zvětšení povrchu elektrody i různé polymerní látky nebo biopolymery [39].

1.2.3.4 Mikroelektrody

Elektrody s malými rozměry v řádu μm se nazývají mikroelektrody. Tyto elektrody jsou velmi rozšířené jako pracovní elektrody ve stopové voltametrické analýze. Velikost elektrody zvyšuje proudovou hustotu na povrchu elektrody [39].

1.2.4. Borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE)

Samotný přírodní diamant nemůže být použit jako elektrodový materiál, protože má vlastnosti izolátoru. Proto se pro elektrochemické účely dopuje různými prvky. Tím se z diamantu stane vodivý materiál. Nejčastěji se provádí dopování diamantu borem a využívá se tedy borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE) [43]. Ta byla pro elektroanalytické účely využívána od počátku devadesátých let [44]. Diamant v hybridizaci uhlíku sp^3 s čtyřbokou vazbou se vyznačuje vlastnostmi jako je extrémní tvrdost, tepelná vodivost, nízký koeficient tření a chemická inertnost [43]. Přítomnost sp^2 nediamantových uhlíků, které představují nečistoty v materiálu elektrody, způsobuje zúžení potenciálového okna nebo zvýšení proudu, což vede ke zhoršení elektrochemických vlastností [45].

Diamantová elektroda může být polykrystalická, nanokrystalická, mikrokystalická nebo ultra nanokrystalická. Lze vyrobit celkem čtyři druhy diamantových elektrod mezi které patří elektroda s dopovaným diamantovým filmem uloženým přímo na vodivém substrátu, dopovaná diamantová částicová elektroda, elektroda s diamantovými částicemi znehybněnými v izolační vrstvě a elektroda s mezivrstvou mezi diamantovou folií a substrátem [43]. BDDE lze považovat za velmi vhodný elektrodový materiál pro elektroanalýzu. Mezi její jedinečné elektrochemické vlastnosti, patří vysoká stabilita, nízké proudy pozadí, široký využitelný rozsah potenciálů, vysoká citlivost, elektrolýza s vysokou hustotou proudu a nízké

detekční limity. Materiál elektrody je biokompatibilní a je možné povrch elektrody rovněž modifikovat různými modifikátory [46-48].

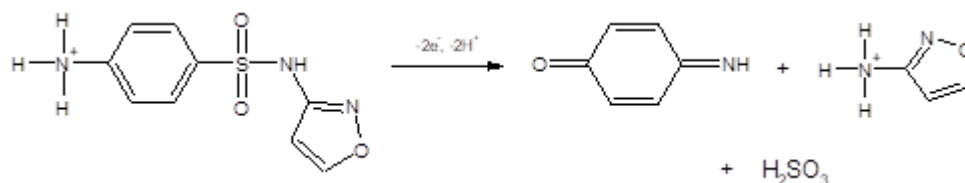
Vzhledem k vynikajícím elektrochemickým vlastnostem našla BDDE své uplatnění v mnoha oblastech elektroanalytické chemie. Mnoho článků bylo zaměřeno na stanovení celé řady zejména organických látek, konkrétně léčiv, pesticidů, biomarkerů různých onemocnění, kontaminantů životního prostředí, karcinogenních i jiných látek ohrožujících zdraví lidí. Publikované poznatky byly shrnuty v řadě přehledových prací [49-54]. Vedle elektroanalytické chemie se BDDE využívá rovněž při úpravách odpadních vod znečištěných např.: pesticidy, farmaceutiky nebo barvivy [55].

1.2.5. Voltametrické stanovení SMX

Elektrochemické metody jsou oblíbené vzhledem k jejich vysoké citlivosti, selektivitě, nízkým nákladům a často velice jednoduché přípravě vzorku k analýze. Voltametrické stanovení SMX popsané v literatuře bylo založeno na jeho oxidaci s využitím různým způsobem modifikovaných většinou uhlíkových pracovních elektrod. Přehledně jsou tyto metody shrnuty v Tabulce 3, a to včetně dosažených detekčních limitů.

Nejčastěji se pro stanovení SMX využívají elektrody modifikované uhlíkovými nanomateriály. Nejjednoduššími popsanými senzory byly uhlíková pastová elektroda připravená přímo z uhlíkových nanotrubiček (MWCN/PE) [56] nebo elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná uhlíkovými nanotrubičkami (MWCN/GCE) [57]. Další variantou bylo použití tištěné elektrody (SPE) modifikované oxidem grafenu redukováným kyselinou askorbovou (AArGO/SPE) [58]. Velice perspektivním způsobem modifikace elektrod je aplikace nanokompozitních materiálů. V případě stanovení SMX byly použity kompozity tvořené stříbrnými nanočásticemi a uhlíkovými nanotrubičkami (Ag-MWCNT/GCE) [59], antimonovými nanočásticemi s MWCNT a parafinem (Sb-MWCNT/parafin) [60] nebo nanočásticemi oxidu ceričitého a chitosanem (CeO₂/CHIT/GC) [61]. Autoři dalších prací použily pro stanovení SMX GCE modifikovanou poly-1,5-diaminonaftalenem (p-DAN/GCE) [62]. Dalším, již poměrně komplikovaným senzorem popsaným v literatuře byla CPE modifikovaná komplexem [5,10,15,20-tetrakis (3-methoxy-4-hydroxy fenyloxy) porfyrinato] měďnatým (TMHPP Cu (II)/CPE) [63]. V neposlední řadě byl pro stanovení SMX vyvinut také jednorázový amperometrický biosenzor, kdy byl na povrch tištěné uhlíkové elektrody předem modifikované nanočásticemi zlata navázán enzym Tyrosináza (TYR-Au/SPE) [64].

Někteří autoři se zabývali rovněž mechanismem oxidace SMX a uvádějí, že dochází k oxidaci aminoskupiny za vzniku iminobenzochinonu [63]. Schéma oxidace je uvedeno na obrázku 12.



Obrázek 12 Mechanismus oxidace aminoskupiny v sulfamethoxazolu na iminobenzochinon [63].

Tabulka 3 Přehled metod publikovaných v odborné literatuře pro stanovení SMX

elektroda	metoda	elektrolyt	LOD [mol/l]	vzorek	citace
MWCN/PE	DPV	AcB (0,1 mol/l, pH = 6)	$3,9 \times 10^{-7}$	léky	[56]
MWCN/GCE	DPV	PB (0,1 mol/l, pH = 8)	$1,0 \times 10^{-5}$	moč, léky	[57]
AArGO/SPE	DPV	PB (0,1 mol/l, pH = 6)	$4,0 \times 10^{-8}$	moč, pitná a jezerní voda	[58]
Ag-MWCNT/GCE	DPV	PB (0,1 mol/l, pH = 6)	$1,0 \times 10^{-8}$	moč, léky	[59]
Sb-MWCNT/parafin	DPV	BRB (0,2 mol/l, pH = 7)	$2,4 \times 10^{-8}$	přírodní voda	[60]
CeO ₂ /CHIT/GC	DPV	Thionin acetát (0,002 mol/l)	$1,2 \times 10^{-9}$	potraviny	[61]
p-DAN/GCE	SWV	PB (1,0 mol/l, pH = 7,2)	$5,0 \times 10^{-11}$	moč, léky	[62]
TMHPP Cu (II)/CPE	DPV	PB (0,1 mol/l, pH = 6)	$1,5 \times 10^{-9}$	moč, léky	[63]
TYR-Au/SPE	A	PB (pH = 8)	$2,2 \times 10^{-5}$	různé vody	[64]

Zkratky: A – amperometrie, AcB – acetátový pufr, AArGO/SPE – tištěná elektroda modifikovaná oxidem grafenu redukováným kyselinou askorbovou, Ag-MWCNT/GCE – stříbrnými nanočásticemi a uhlíkovými nanotrubičkami modifikovaná elektroda ze skelného uhlíku, BRB – Brittonův–Robinsonův pufr, CeO₂/CHIT/GC – elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná nanokompozitem oxidu ceričitého a chitosanu, MWCN/GCE – elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná uhlíkovými nanotrubičkami, MWCN/PE – uhlíková pastová elektroda připravená z uhlíkových nanotrubiček, p-DAN/GCE – poly-1,5-diaminonafalen modifikovaná elektroda ze skelného uhlíku, Sb-MWCNT/parafin – kompozit antimonových nanočástic s MWCNT a parafinem, TMHPP Cu (II)/CPE – uhlíková pastová elektroda modifikovaná komplexem [5,10,15,20-tetrakis(3-methoxy-4-hydroxyfenyl) porfyrinato] měďnatým, TYR-Au/SPE – tištěná uhlíková elektroda modifikovaná nanočásticemi zlata s navázaným enzymem Tyrosináza.

2. Experimentální část

2.3. Přístrojové vybavení

Pro voltametrická měření byl použit přístroj Eco-Tribo Polarograph (Polaro-Sensors, Praha) vybavený softwarem POLAR.PRO 5.1. Uspořádání elektrochemického článku bylo tříelektrodové, kdy jako pracovní elektroda sloužila borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE) s poměrem B/C během depozice 1000 ppm (Windsor Scientific, Velká Británie). Referentní byla nasycená argentchloridová elektroda a pomocnou elektrodu tvořil platinový drátek (obě Monokrystaly, Turnov). Hodnoty pH byly měřeny s využitím pH-metru Fisher Scientific AB 150 (Fisher Scientific, Pardubice), při přípravě roztoků byly používány analytické váhy (Denver Instrument, New York) a ultrazvuková lázeň Bandelin SONOREX (Schalltec GmbH, Německo). Přesné objemy roztoků byly dávkovány pomocí mikropipet Eppendorf (Eppendorf Research, Německo).



Obrázek 13 polarografický analyzátor Eco-Tribo Polarograph (Polaro-Sensors, Praha) [65]

2.4. Použité chemikálie

Brittonův-Robinsonův pufr (BRB, pH 2-12) byl připraven smícháním kyselých a alkalických složek s využitím pH-metru. Kyselou složkou byl 0,04 mol/l roztok H_3PO_4 , H_3BO_3 a CH_3COOH a alkalickou tvořil 0,2 mol/l NaOH. Roztok 0,1 mol/l HNO_3 byl připraven ředěním z koncentrované 65% kyseliny (Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o., Praha). Dále byly testovány elektrolyty 0,1 mol/l KCl, 0,1 mol/l acetátový pufr (AcB) 0,1 mol/l fosfátový pufr (PB), 0,1 mol/l KSCN, 1 mol/l borátový pufr (BB), 1 mol/l amoniakální pufr (AB) a 0,1 mol/l NaOH

(všechny chemikálie použité k přípravě pocházely od firmy Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o., Praha). Standardní roztok SMX o koncentraci 1×10^{-3} mol/l (Sigma-Aldrich) byl připraven rozpuštěním příslušné navážky v acetonitrilu (Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o., Praha) a uchováván v lednici bez přístupu světla. Roztoky s nižší koncentrací byly připravovány denně čerstvé ředěním tohoto zásobního roztoku základním elektrolytem. Standardní roztok TMP o koncentraci 1×10^{-3} mol/l (Sigma-Aldrich) byl připraven opět rozpuštěním pevné látky v acetonitrilu a uchováván v lednici. Jako reálný vzorek byl analyzován farmaceutický přípravek Biseptol, jehož výrobcem je Adamed Praha.

2.5. Pracovní postupy

2.5.1. Voltametrická měření

Na začátku práce byla BDDE vyleštěna pomocí aluminy a následně na 5 min. umístěna do ultrazvuku. Aktivace elektrody probíhala vždy na začátku pracovního dne zařazením 20 cyklických voltamogramů v roztoku aktuálně používaného základního elektrolytu. Parametry cyklické voltametrie (CV) při aktivaci byly následující: počáteční potenciál ($E_{poč}$) -1000 mV, potenciál obratu (E_{obratu}) $+2000$ mV, konečný potenciál (E_{kon}) $+2000$ mV, rychlost polarizace (v) 100 mV/s. Mezi jednotlivými sériemi měření byla BDDE regenerována/aktivována zařazením 20 cyklů za stejných podmínek.

Při studiu voltametrického chování SMX byla použita metoda CV a byl sledován vliv pH prostředí, resp. složení základního elektrolytu, a rychlosti polarizace na oxidační signál. Parametry CV byly následující: $E_{poč}$ -1000 mV, E_{obratu} $+2000$ mV, E_{kon} -1000 mV, v 100 mV/s pro studii vlivu pH a $50-500$ mV/s pro studii vlivu rychlosti polarizace. Pro vývoj metody stanovení SMX byla vzhledem k vyšší citlivosti použita diferenční pulzní voltametrie (DPV) a byly navrženy následující optimální parametry: $v = 40$ mV/s, *výška pulzu* = $+50$ mV a *šířka pulzu* = 20 ms.

Všechna měření probíhala za laboratorní teploty (23 ± 2 °C). Výšky píků (I_p) byly vyhodnocované od základní linie tvořené přímkou spojující minima před a za píkem.

2.5.2. Analýza farmaceutického přípravku metodou DPV

Pro analýzu byl jako praktický vzorek použit lék Biseptol s obsahem 400 mg SMX a 80 mg TMP, který je uveden na obrázku 14. Vzorek byl připraven rozdrcením jedné tablety Biseptolu v třecí misce. Vzniklý prášek byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky

a rozpuštěn v acetonitrilu. Pro podporu rozpouštění vzorku byla použita ultrazvuková lázeň. Vzorek byl skladován v lednici bez přístupu světla.

Vzorek byl analyzován s využitím metody standardního přídatku, stanovení bylo 5× zopakováno a z výsledků byly vypočteny statistické parametry jako průměrná koncentrace s příslušným intervalem spolehlivosti, výtěžnost a relativní směrodatná odchylka (RSD_5). Stanovení probíhalo v prostředí KCl o koncentraci 0,1 mol/l a fosfátového pufru o pH 7 metodou DPV ve spojení s BDDE. Do polarografické nádoby s 10 ml BRB byl přidán 1 μ l připraveného roztoku Biseptolu a byla provedena analýza. Poté byly přidány 2-3 přídatky standardního roztoku SMX ($V = 10 \mu\text{l}$, $c_{\text{SMX}} = 1 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$).

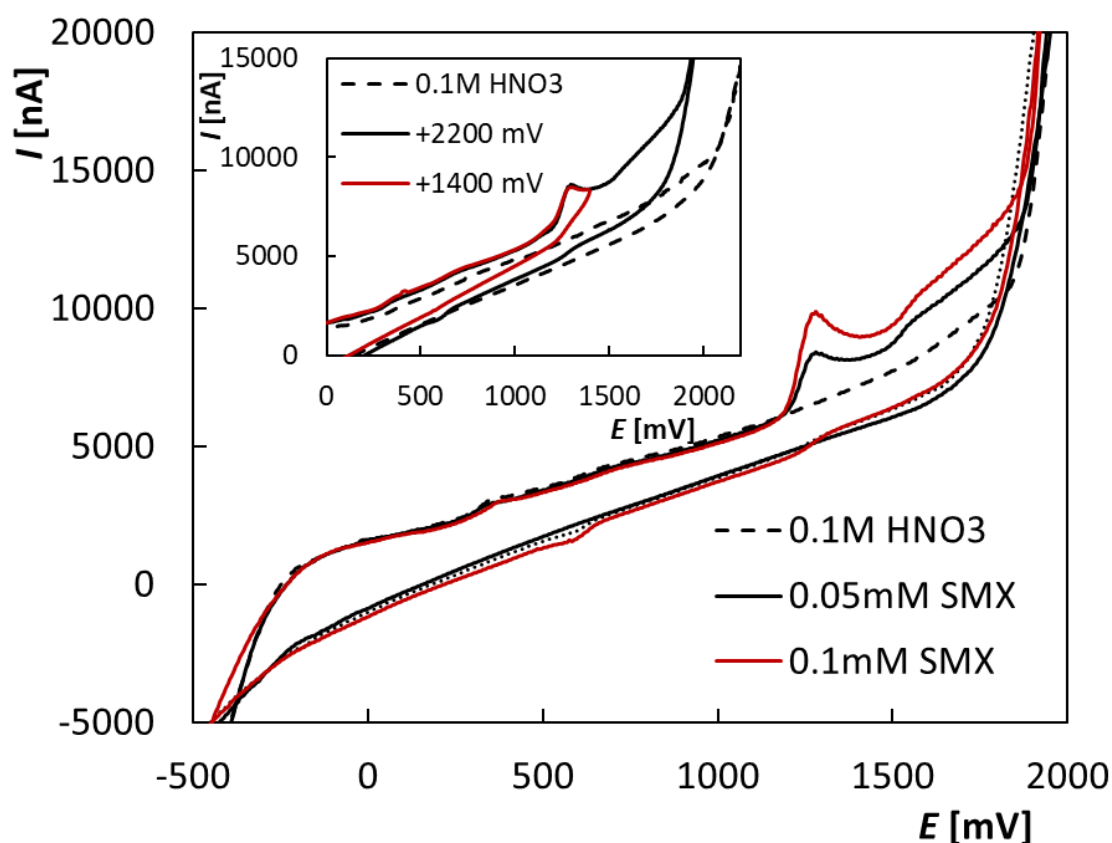


Obrázek 14 Obal léku Biseptolu představujícího praktický vzorek [66]

3. Výsledky a diskuse

3.1. Studium voltametrického chování sulfamethoxazolu

Na úvod experimentální části práce bylo studováno voltametrické chování SMX. Byl změřen jeho cyklický voltamogram na BDDE. Měření probíhalo v prostředí 0,1 mol/l HNO_3 od počátečního potenciálu -1000 mV do potenciálu obratu $+2000$ mV rychlostí polarizace 100 mV/s. V prvním kroku byl změřen cyklický voltamogram pouze v rotoku základního elektrolytu a poté byly přidány dva přídatky SMX. Koncentrace v roztoku v polarografické nádobce byla 5×10^{-5} a 1×10^{-4} mol/l. Byly detekovány dva oxidační signály a to při potenciálu $+1300$ mV a $+1500$ mV. Získané cyklické voltamogramy jsou uvedeny na obrázku 14.



Obrázek 15 Cyklické voltamogramy SMX zaznamenané na BDDE v prostředí 0,1 mol/l HNO_3 .
Parametry: $E_{poč} = -1000$ mV, $E_{obratu} = +2000$ mV, $v = 100$ mV/s, $c_{SMX} = 5 \times 10^{-5}$ a 1×10^{-4} mol/l.

Odpovídající redukční signál nebyl za daných podmínek pozorován, což svědčí o ireverzibilním průběhu elektrodové reakce. Tento závěr byl potvrzen i po změně potenciálu

obratu, který byl posunut těsně za první oxidační pík SMX. Tím bylo zamezeno následným reakcím, jež by znemožňovaly zpětnou redukci oxidačních produktů. Ani v tomto případě nebyl pozorován žádný redukční signál. Vzhledem k poloze, tvaru a lepší vyhodnotitelnosti byl pro analytické účely v další práci využíván první oxidační pík SMX.

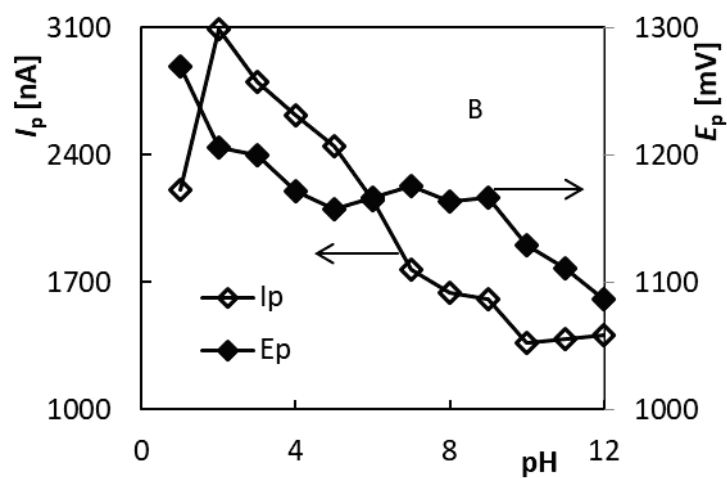
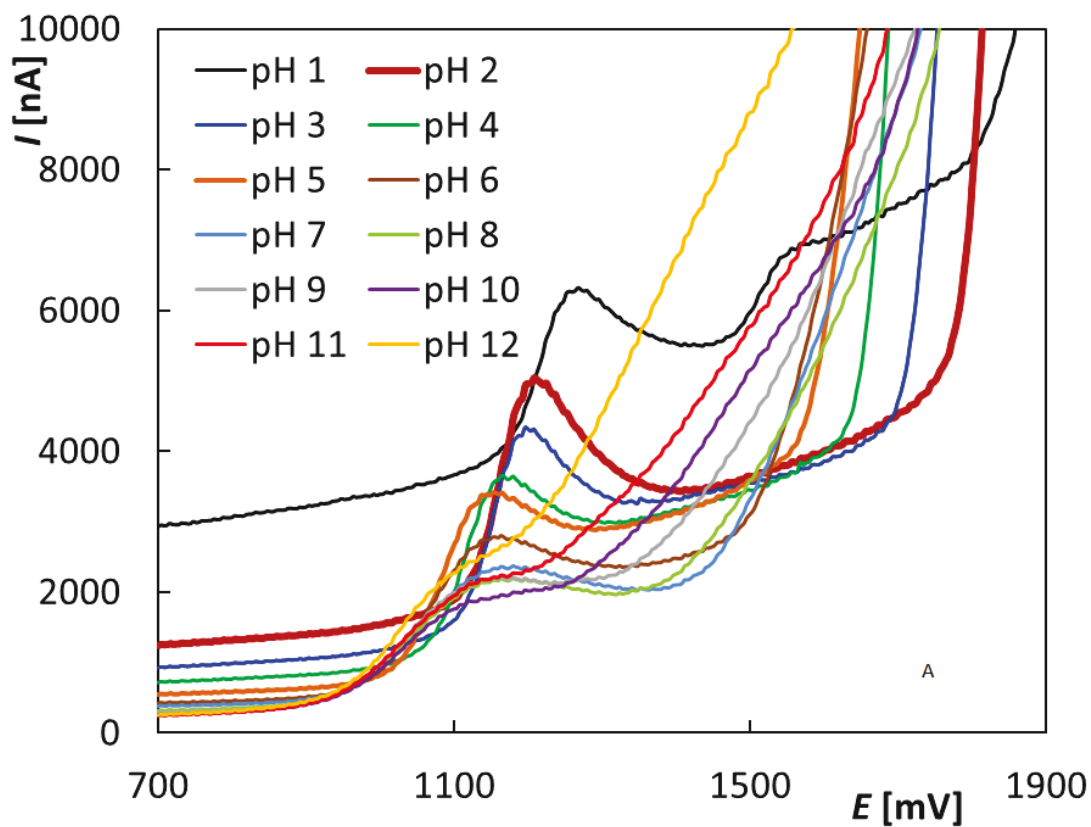
3.1.1. Závislost na pH základního elektrolytu

Složení základního elektrolytu, zejména pak jeho pH, významně ovlivňuje voltametrické chování látek. Proto byla sledována také závislost voltametrického chování SMX na pH. Použita byla opět CV. Jako základní elektrolyt sloužil roztok HNO₃ o koncentraci 0,1 mol/l (pH ~ 1) a BRB v rozsahu pH 2-12. Koncentrace SMX v polarografické nádobce byla pro tato měření 1×10^{-4} mol/l. Pro lepší přehlednost jsou na obrázku 16A uvedeny pouze anodické části zaznamenaných cyklických voltamogramů. Měření probíhalo v rozsahu potenciálu -1000 až +2000 mV při rychlosti polarizace 100 mV/s.

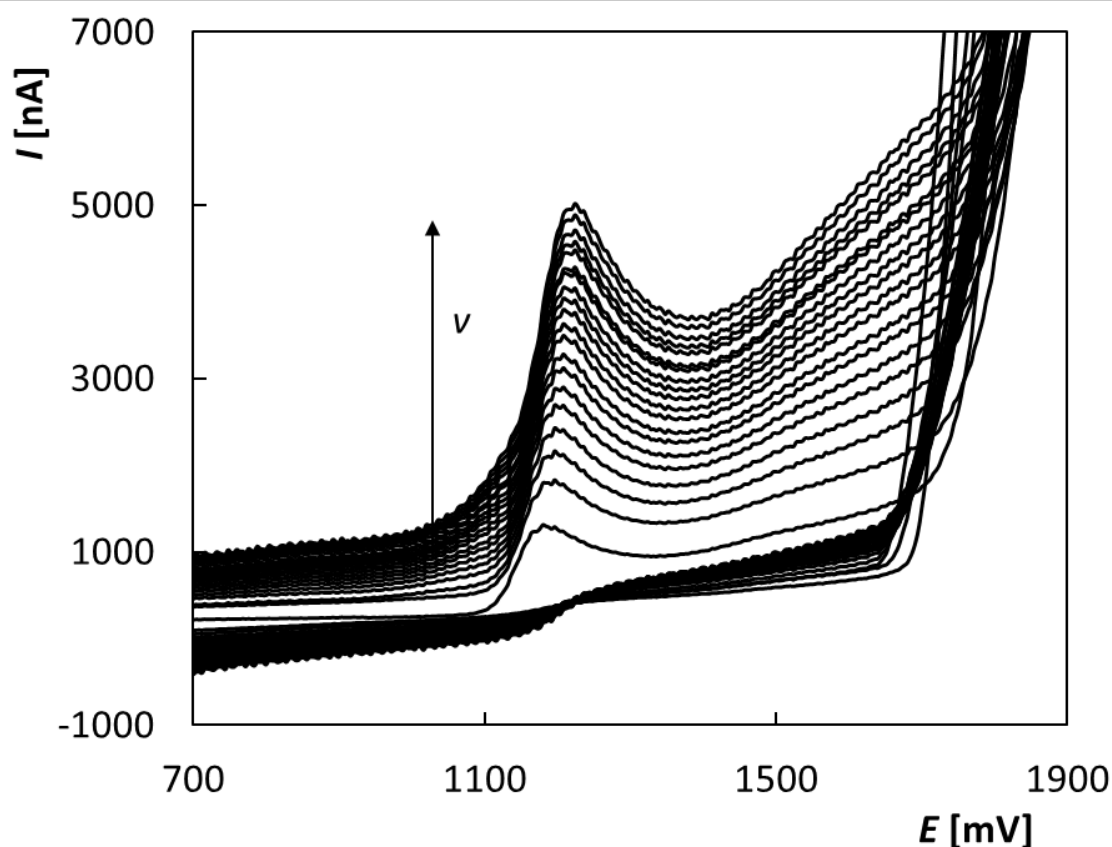
Z obrázku je zřejmé, že 2 píky byly pozorovány pouze v silně kyselém prostředí. Při vyšším pH byl zaznamenán již jen jeden anodický signál, který byl patrný v celém studovaném rozsahu pH. S rostoucí hodnotou pH docházelo k posunu tohoto píku směrem k méně pozitivním potenciálům. Tento trend je dokumentován i závislostí potenciálu píku (E_p) na pH uvedenou na obrázku 16B. Současně je z obrázku vidět, že s rostoucí hodnotou pH dochází ke snížení výšky píku (I_p) SMX. Výjimkou je prostředí kyseliny dusičné, které se ovšem liší od ostatních prostředí nejen hodnotou pH, ale i iontovou silou. Pro následující měření byl vybrán jako základní elektrolyt BRB o pH 2 vzhledem k tomu, že v uvedeném prostředí byl získán nejvyšší a nejlépe vyhodnotitelný pík.

3.1.2. Závislost na rychlosti polarizace

Další experiment byl zaměřen na určení řídicího děje sledované elektrodové reakce na základě studia voltametrického chování SMX v závislosti na rychlosti polarizace. Měření probíhalo opět metodou CV v prostředí BRB o pH 2 v rozsahu potenciálů -1000 až +2000 mV. Koncentrace SMX v polarografické nádobce byla 5×10^{-5} mol/l. Rychlost polarizace se měnila v rozsahu od 25 do 500 mV/s a byla navyšována vždy po 25 mV/s. Zaznamenané cyklické voltamogramy jsou zobrazeny na obrázku 17. Je vidět, že s rostoucí rychlostí polarizace docházelo k nárůstu proudové odezvy SMX a současně se pík posouval k pozitivnějším hodnotám potenciálu, což odpovídá ireverzibilnímu průběhu reakce.



Obrázek 16 A – Anodické části cyklických voltamogramů SMX zaznamenané na BDDE v závislosti na pH. Parametry: elektrolyt: 0,1 mol/l HNO_3 (pH ~ 1), BRB (pH 2-12), $E_{poč} = -1000$ mV, $E_{obratu} = +2000$ mV, $v = 100$ mV/s, $c_{SMX} = 1 \times 10^{-4}$ mol/l; **B** – Graf závislosti I_p a E_p SMX na pH.

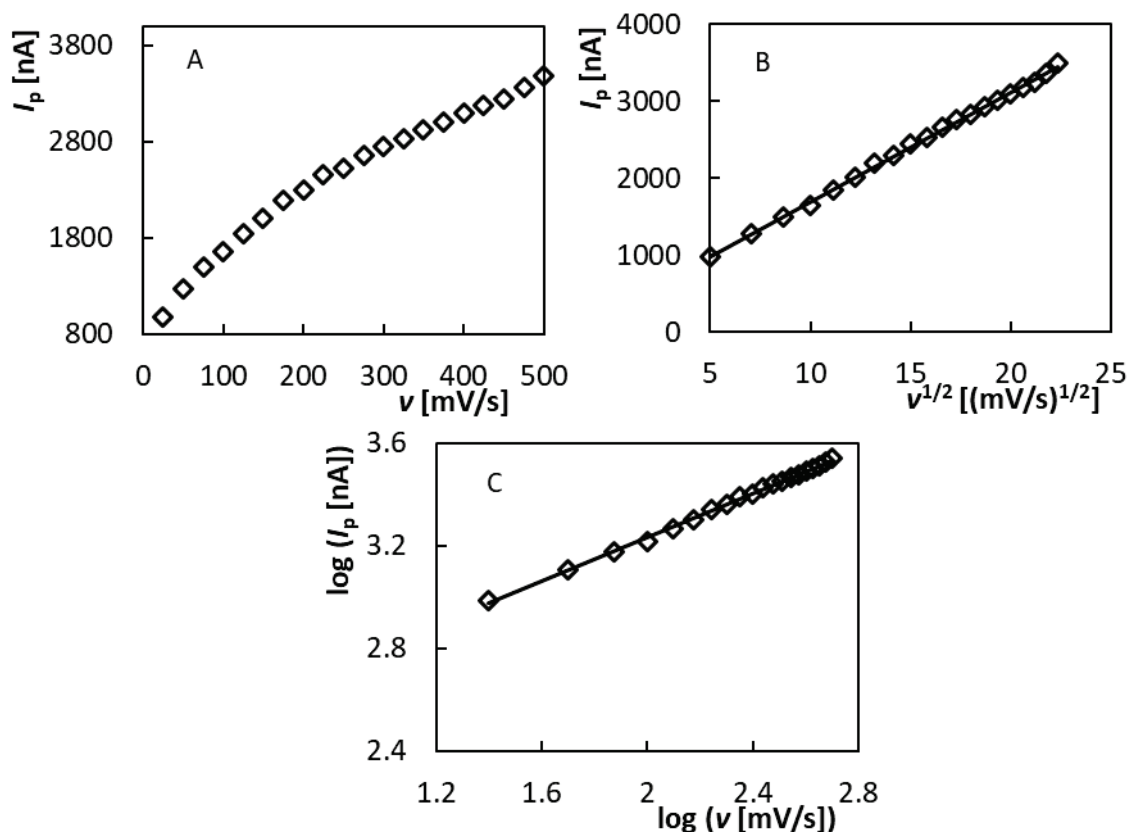


Obrázek 17 Cyklické voltamogramy SMX zaznamenané na BDDE v závislosti na rychlosti polarizace. Parametry: elektrolyt BRB (pH 2), $E_{poč} = -1000$ mV, $E_{obratu} = +2000$ mV, $v = 25-500$ mV/s, $c_{SMX} = 5 \times 10^{-5}$ mol/l.

Na obrázku 18 jsou vyneseny jednotlivé závislosti I_p na v , resp. $v^{1/2}$ a logaritická závislost $\log(I_p)$ na $\log(v)$. Z obrázku 18A je patrné, že I_p neroste lineárně s výškou píku a nejedná se tedy o adsorpci řízenou reakci. Naopak závislost I_p na $v^{1/2}$ (obrázek 18B) vykazuje lineární průběh a je charakterizována na rovnici (3) s příslušným korelačním koeficientem. Jedná se tedy s největší pravděpodobností o difuzně řízenou reakci. Pro potvrzení tohoto závěru byla vynesena ještě logaritická závislost (obrázek 18C), kterou popisuje rovnice (4). Pro určení řídicího děje je důležitá hodnota směrnice této závislosti, která se blíží teoretické hodnotě 0,5 ($0,4290 \pm 0,0041$) pro difuzně řízenou reakci. Tento závěr je typický pro reakce probíhající na povrchu použité BDDE.

$$I_p [\text{nA}] = (142,3 \pm 1,19) v [(\text{mV/s})^{1/2}] + (269,95 \pm 19,4), r = 0,9994 \quad (3)$$

$$\log(I_p [\text{nA}]) = (0,429 \pm 0,0041) \log(v [\text{mV/s}]) + (2,375 \pm 0,009), r = 0,9992 \quad (4)$$



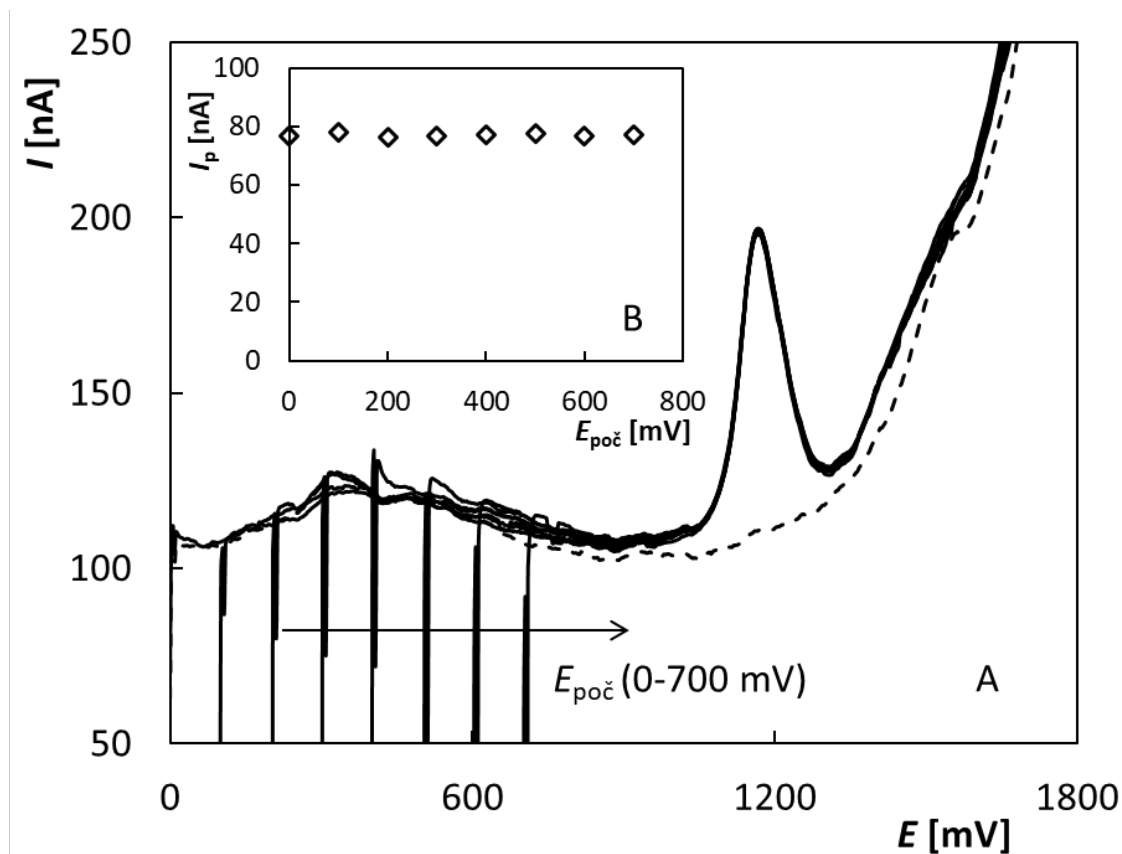
Obrázek 18 A – Závislost I_p na v , B – závislost I_p na $v^{1/2}$, C – závislost $\log(I_p)$ na $\log(v)$. Parametry stejné jako u obrázku 17.

3.2. Vývoj metody stanovení SMX

3.2.1. Stanovení optimálních podmínek DPV

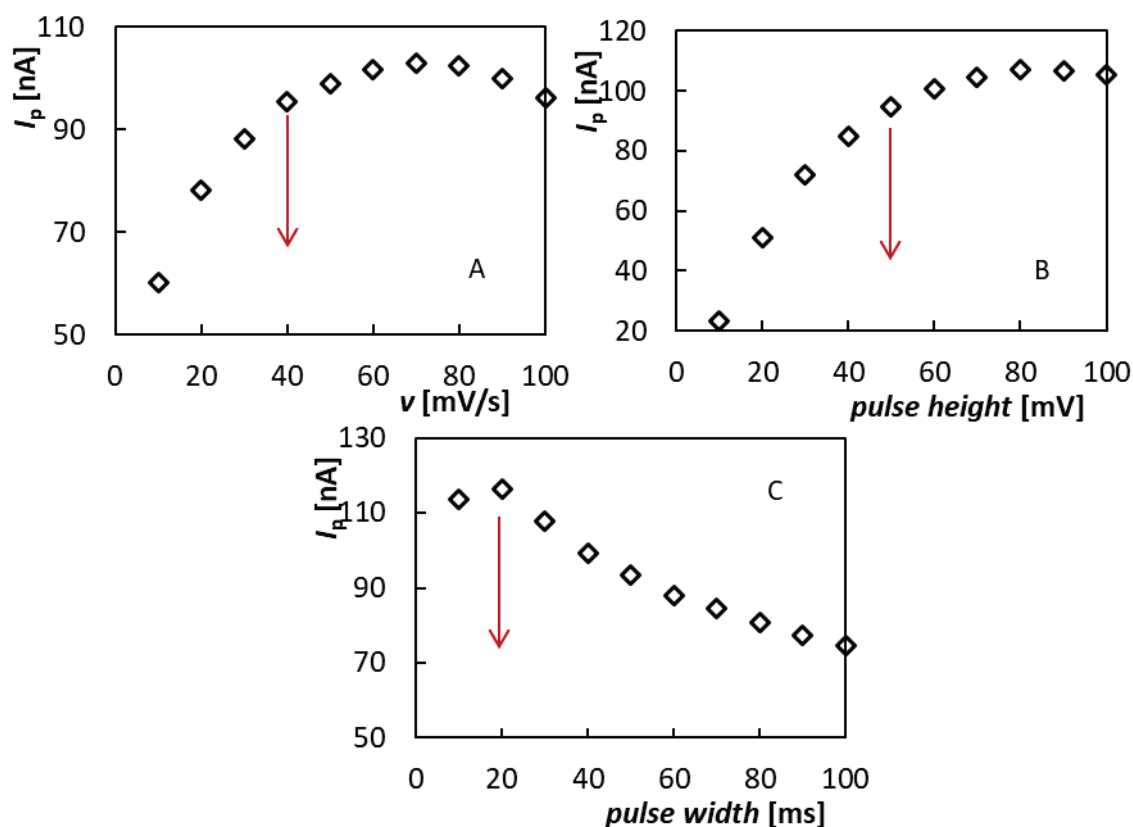
Jako metoda vhodná pro stanovení SMX byla zvolena DPV, protože obvykle umožňuje stanovení mnohem nižších koncentrací než CV, resp. DCV. Velmi důležitým krokem je určení optimálních parametrů této metody. Všechny následující experimenty byly provedeny v prostředí BRB o pH 2 a koncentrace studované látky byla $2,5 \times 10^{-6}$ mol/l.

Nejprve byl studován vliv počátečního potenciálu na pík SMX z důvodu možného zkrácení doby analýzy. Na obrázku 19 jsou uvedeny DP voltamogramy SMX při zařazení $E_{poč}$ od 0 do +700 mV. Další parametry byly nastaveny následovně: $v = 20$ mV/s, výška pulzu = +50 mV, šířka pulzu = 50 ms a $E_{kon} = +1800$ mV. Z obrázku i vložené závislosti I_p na $E_{poč}$ je evidentní, že počáteční potenciál nastavený v rozumném rozsahu neměl žádný vliv na tvar ani výšku píku SMX. Vzhledem k časové úspoře byl pro další měření nastaven $E_{poč} +500$ mV.



Obrázek 19 A – DP voltamogramy SMX ($2,5 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$) zaznamenané na BDDE v závislosti na E_{poc} . Parametry: elektrolyt: BRB (pH 2), $E_{poc} = 0-+700 \text{ mV}$, $E_{kon} = +1800 \text{ mV}$, $v = 20 \text{ mV/s}$, výška pulzu = $+50 \text{ mV}$, šířka pulzu = 50 ms ; B – závislost I_p na E_{poc} .

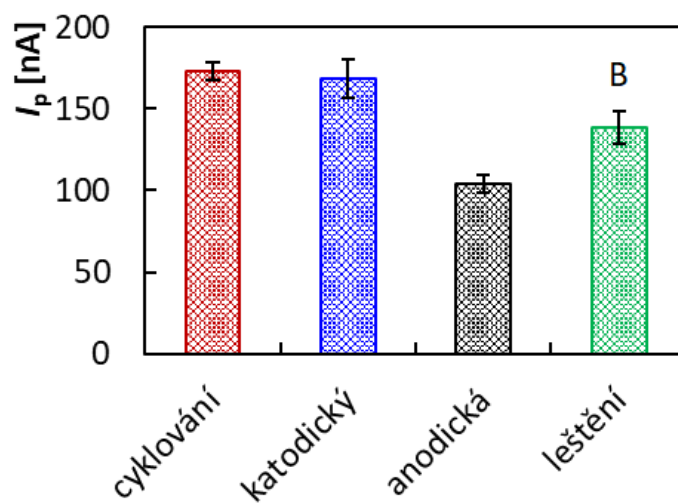
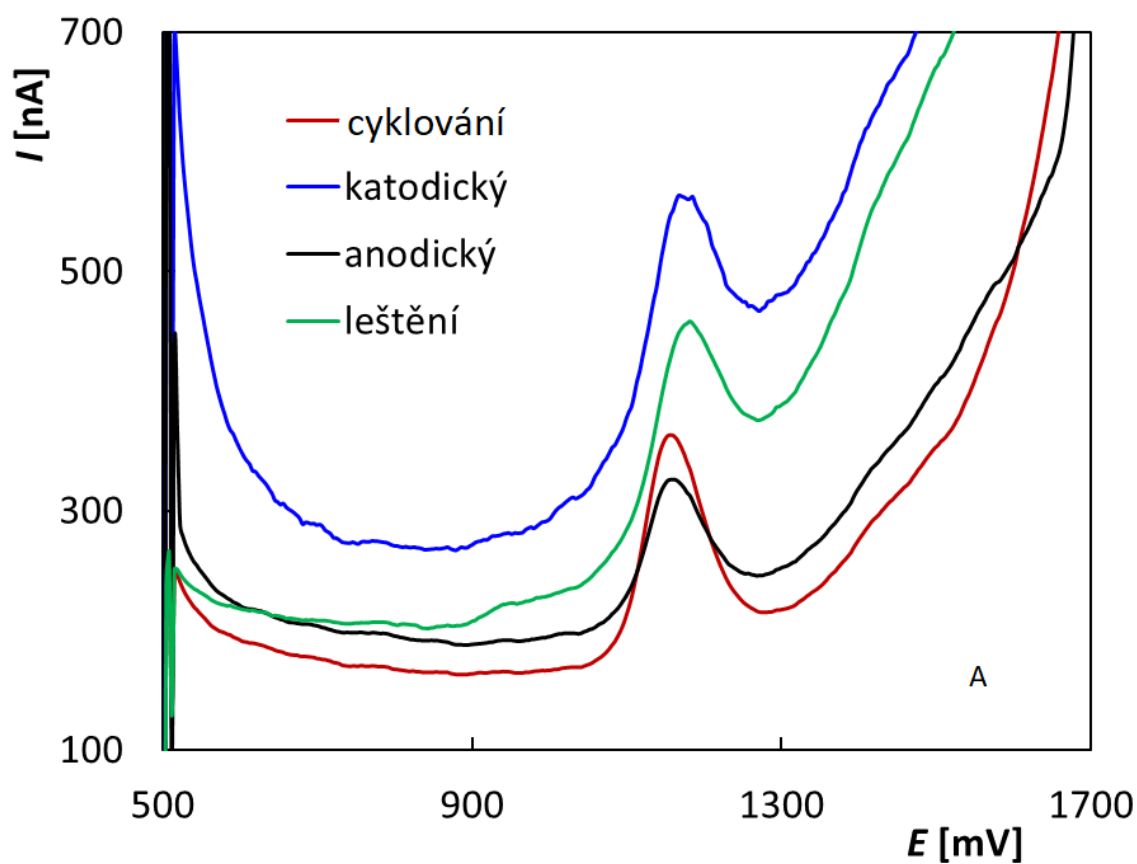
Jako další byla optimalizována rychlost polarizace, která byla testována v rozsahu od 10 do 100 mV/s. Ostatní parametry byly udržovány konstantní a konkrétní hodnoty jsou uvedeny u obrázku 20A. Z něj je vidět, že velikost I_p rostla významně se zvyšující se rychlostí do 40 mV/s a pak již byl nárůst pozvolnější do 70 mV/s. Poté začala proudová odezva opět klesat. Pro další měření byla nastavena hodnota rychlosti polarizace 40 mV/s. Následovalo testování vlivu výšky pulzu, která byla měněna od +10 do +100 mV. Závislost I_p na výšce pulzu (obrázek 20B) rostla do hodnoty 70 mV, ale významný byl nárůst pouze do 50 mV. Proto byla pro další měření zvolena tato hodnota výšky pulzu. Posledním parametrem DPV, jehož vliv na odezvu SMX byl studován, byla šířka pulzu. Ta byla měněna od 10 do 100 ms. Ze závislosti I_p na šířce pulzu na obrázku 20C je vidět, že nejvyšší pík byl zaznamenan při 20 ms a poté se proudová odezva snižovala. Pro další měření byla vybrána jako optimálního hodnota šířky pulzu 20 ms.



Obrázek 20 Závislosti I_p na SMX v (A), výšce pulzu (B) a šířce pulzu (C) zaznamenané na BDDE. Parametry: elektrolyt: BRB (pH 2), $E_{poč} = +500$ mV, $E_{kon} = +1800$ mV, $v = 10$ -100 mV/s (A), 40 mV/s (B, C), výška pulzu = +50 mV (A, C), +10-+ 100 mV (B), šířka pulzu = 50 ms (A, B), 10-100 ms (C), $c_{smx} = 2,5 \times 10^{-6}$ mol/l

3.2.2. Předúprava BDDE

Předúprava elektrody se provádí pro zlepšení elektrochemických vlastností BDDE, zejména kvůli zvýšení citlivosti ke studovanému analytu. V rámci této práce byly testovány čtyři možnosti předúpravy, mezi které patří katodická předúprava (-1000 mV, 300 s) za vzniku H-terminovaného povrchu BDDE a anodická předúprava (+2000 mV, 300 s) za vzniku O-terminovaného povrchu. Další procedurou bylo cyklování (20 cyklických voltamogramů v rozsahu potenciálů -1000 až +2000 mV, $v = 100$ mV/s) a metoda leštění pomocí aluminy. Získané DP voltamogramy jsou uvedeny na obrázku 21A. Je zřejmé, že po zařazení cyklování byl pozorován nejlépe vyvinutý signál. Ze závislosti na obrázku 21B je patrné, že I_p byla rovněž největší po cyklování. Proto byl pro další měření zvolen tento postup aktivace BDDE.



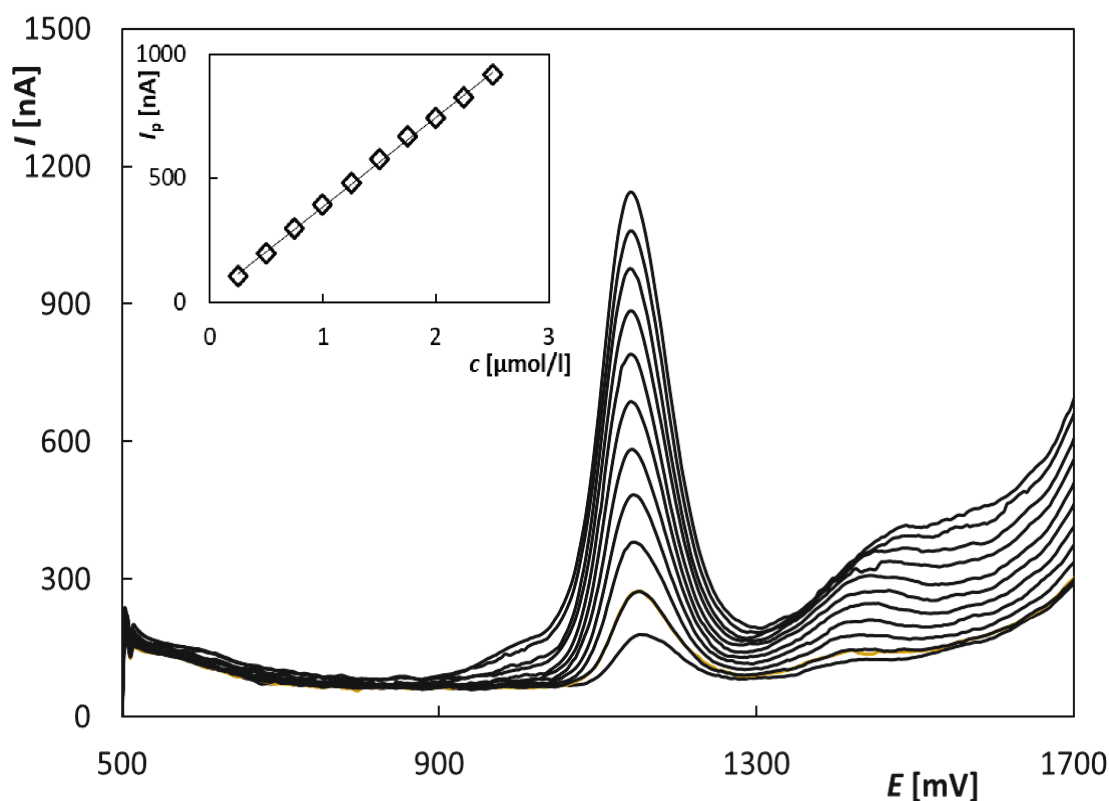
Obrázek 21 A – DP voltamogramy SMX ($2,5 \times 10^{-6}$ mol/l) zaznamenané na BDDE po zařazení jednotlivých postupů předúpravy. Parametry: elektrolyt: BRB (pH 2), $E_{poč} = +500$ mV, $E_{kon} = +1800$ mV, $v = 40$ mV/s, výška pulzu = +50 mV, šířka pulzu = 20 ms; B – závislost I_p na vloženém procesu předúpravy

3.3. Analýza modelových roztoků SMX

3.3.1. Koncentrační závislost

Vyvinutá metoda voltametrického stanovení SMX s využitím DPV v kombinaci s BDDE byla použita při měření řady koncentračních závislostí v modelových roztocích analytu. Na obrázku 22 je uveden příklad pro koncentraci SMX v rozsahu $2,5 \times 10^{-7}$ až $2,5 \times 10^{-6}$ mol/l. Z vložené závislosti I_p na c je patrné, že výška píku s koncentrací roste lineárně. Popisuje ji rovnice (5) s příslušným korelačním koeficientem. Ze změřených koncentračních závislostí byl určen využitelný koncentrační rozsah (LDR) pro stanovení SMX novou metodou a z rovnice (5) byly vypočteny parametry LOD a LOQ, které jsou shrnuty v tabulce 4. Z výsledků vyplývá, že navržená metoda umožňuje stanovení SMX v poměrně širokém koncentračním rozsahu, a to s nízkou mezí detekce, resp. stanovitelnosti.

$$I_p [\text{nA}] = (360,5 \pm 3,9) c [\mu\text{mol/l}] + (23,9 \pm 6,1), r = 0,9997 \quad (5)$$



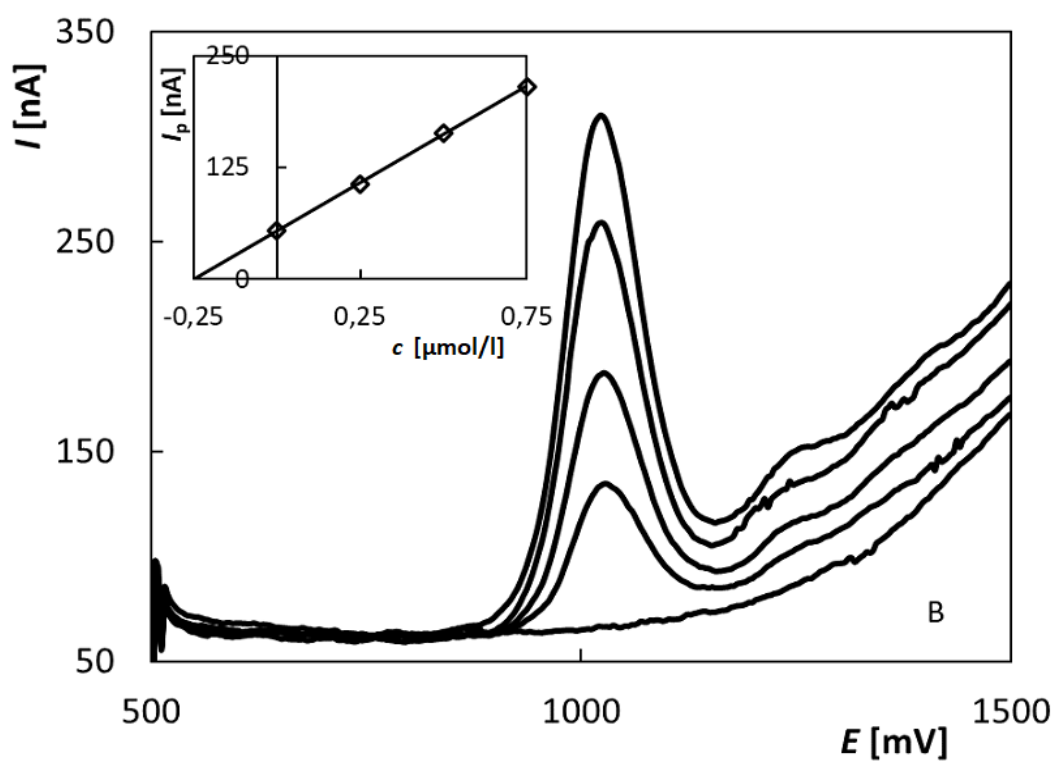
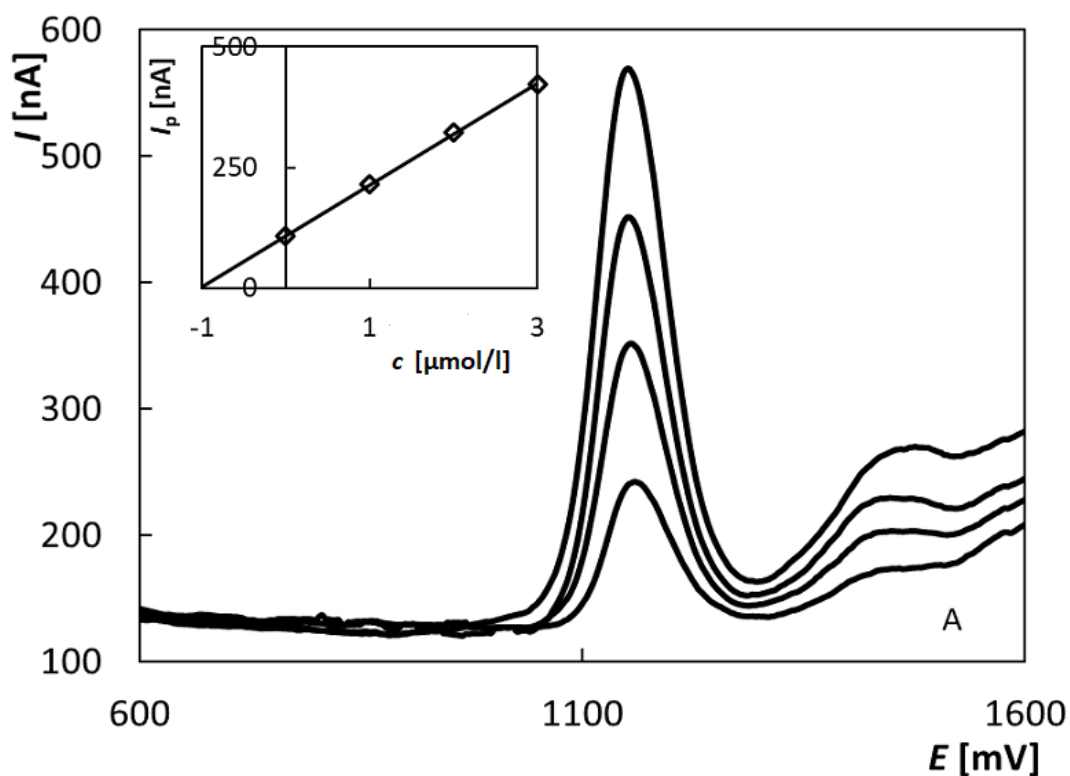
Obrázek 22 DP voltamogramy SMX změřené na BDDE v modelovém roztoku v závislosti na koncentraci. Parametry: elektrolyt: BRB (pH 2), $E_{poč} = +500$ mV, $E_{kon} = +1800$ mV, $v = 40$ mV/s, výška pulzu = +50 mV, šířka pulzu = 20 ms, $c_{SMX} = 2,5 \times 10^{-7}$ – $2,5 \times 10^{-6}$ mol/l.

Tabulka 4 Shrnutí statistických parametrů pro stanovení SMX

LOD [mol/l]	LOQ [mol/l]	LDR [mol/l]
$5,1 \times 10^{-8}$	$1,7 \times 10^{-7}$	$1,5 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-6}$

3.3.2. Opakované stanovení SMX v modelových roztocích

V dalším kroku byla navržená metoda ověřena při opakovaném stanovení SMX v modelových roztocích. Měření probíhala v prostředí 10 ml BRB o pH 2 a zvoleny byly 2 koncentrace analytu v roztoku, konkrétně 1×10^{-6} a $2,5 \times 10^{-7}$ mol/l. Pro vyhodnocení byla použita metoda standardního přídávku, kdy byly do roztoku vzorku přidány do polarografické nádoby vždy 3 přídávky standardního roztoku SMX o koncentraci 1×10^{-3} mol/l. Během měření se ukázalo, že stabilnější signály byly zaznamenány tehdy, pokud bylo mezi jednotlivé analýzy vloženo 5 cyklických voltamogramů v základním elektrolytu za stejných podmínek, jako při výše popsané aktivaci elektrody. Stanovení bylo pro každou koncentraci pětkrát opakováno. Na obrázku 23 jsou uvedeny příklady záznamů těchto analýz pro obě testované koncentrace (1×10^{-6} mol/l obrázek 23A a $2,5 \times 10^{-7}$ mol/l obrázek 23B). Z výsledků opakovaných stanovení byly vypočteny statistické parametry, jako průměrná stanovená koncentrace s odpovídajícím intervalem spolehlivosti, výtěžnost a relativní směrodatná odchylka opakovaného stanovení (RSD_5), které jsou uvedeny v tabulce 5. Z výsledků vyplývá, že použitá metoda DPV s optimalizovanými parametry ve spojení s BDDE umožňuje dosažení správných a velmi dobře opakovatelných výsledků ($RSD_5 < 4 \%$). V případě vyšších koncentrací SMX v roztoku se objevuje druhý oxidační signál ($E_p \sim +1450$ mV), který rovněž roste s koncentrací. Jeho vyhodnocení je však komplikováno počínajícím rozkladem základního elektrolytu.



Obrázek 23 Stanovení SMX v modelových roztocích s využitím DPV ve spojení s BDDE metodou standardního přidavku. Parametry: elektrolyt: BRB (pH 2), $E_{poč} = +500$ mV, $E_{kon} = +1800$ mV, $v = 40$ mV/s, výška pulzu = +50 mV, šířka pulzu = 20 ms, modelový roztok: $V = 10$ ml, $c_{SMX} = 1 \times 10^{-6}$ (A) a $2,5 \times 10^{-7}$ (B) mol/l, standardní přidavek: $V = 10$ (A) a 2,5 (B) μl , $c_{SMX} = 1 \times 10^{-3}$ mol/l.

Tabulka 5 Výsledky opakovaného stanovení SMX v modelových roztocích

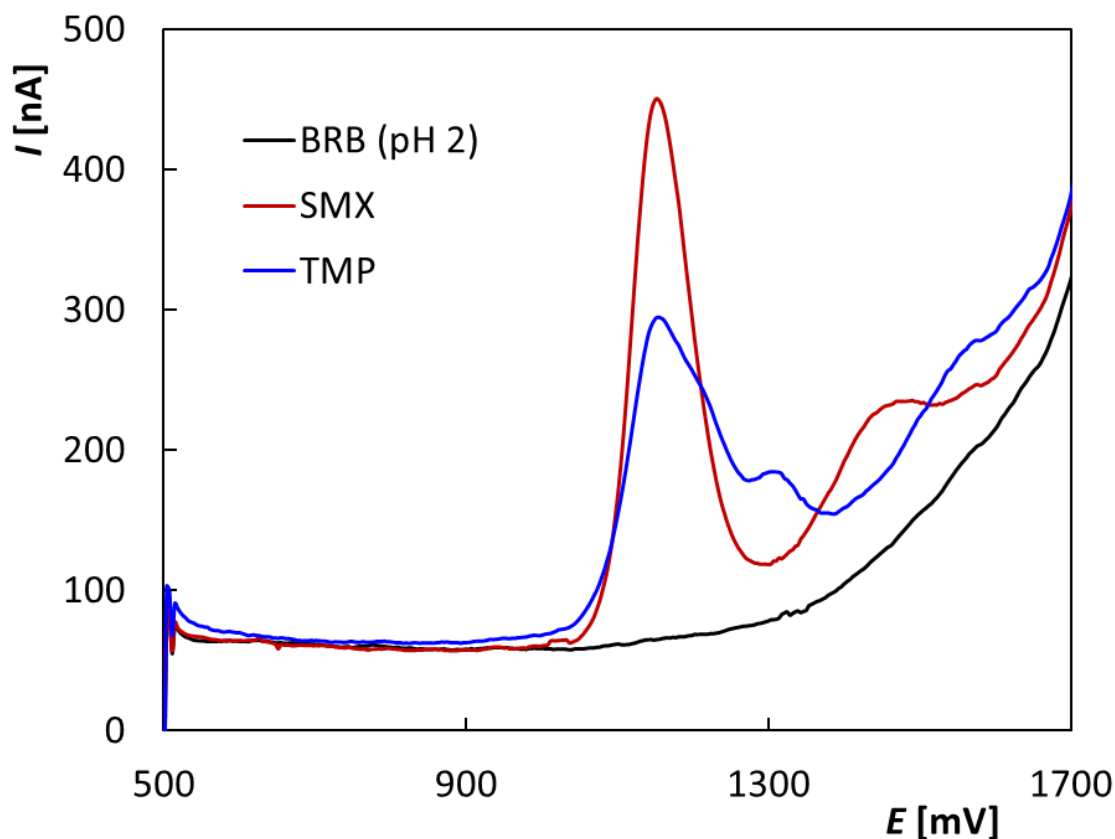
Dáno [mol/l]	Stanoveno [mol/l]	Průměr [mol/l]	Výtěžnost [%]	RSD ₅ [%]
1×10^{-6}	$9,73 \times 10^{-7}$	$(1,006 \pm 0,022) \times 10^{-6}$	97,3-105	3,23
	$1,05 \times 10^{-6}$			
	$1,03 \times 10^{-6}$			
	$9,96 \times 10^{-7}$			
	$9,83 \times 10^{-7}$			
$2,5 \times 10^{-7}$	$2,49 \times 10^{-7}$	$(2,542 \pm 0,057) \times 10^{-7}$	98,8-105,6	3,35
	$2,47 \times 10^{-7}$			
	$2,48 \times 10^{-7}$			
	$2,64 \times 10^{-7}$			
	$2,63 \times 10^{-7}$			

3.4. Analýza farmaceutického přípravku

Poslední část bakalářské práce byla zaměřena na aplikaci vyvinuté metody při analýze praktických vzorků farmaceutických přípravků. Analyzován byl přípravek Biseptol od firmy Adamed Praha. Jedná se o směsný přípravek, který obsahuje 400 mg SMX a 80 mg trimethoprimu (TMP). Přípravek obsahující pouze SMX není na českém trhu dostupný.

3.4.1. Elektrochemické chování trimethoprimu

Nejprve bylo třeba zjistit, jaké je elektrochemické chování TMP při podmínkách navržených pro stanovení SMX. Na obrázku 24 jsou uvedeny DP voltamogramy obou analyzovaných látek zaznamenané na BDDE v prostředí BRB (pH 2). Koncentrace SMX je 5×10^{-6} mol/l a TMP 1×10^{-6} mol/l, tedy 5× nižší. Tento poměr koncentrací byl zvolen proto, že odpovídá zastoupení obou látek v analyzovaném přípravku. Bylo zjištěno, že TMP poskytuje v daném prostředí významný oxidační pík při stejném potenciálu (okolo +1100 mV) jako SMX. Navržená metoda a zejména použitý základní elektrolyt tedy neumožňuje stanovení SMX v přípravcích s obsahem obou účinných látek. Další experimenty byly proto zaměřeny na možnost rozdělení uvedené směsi pomocí změny základního elektrolytu, resp. pH prostředí.



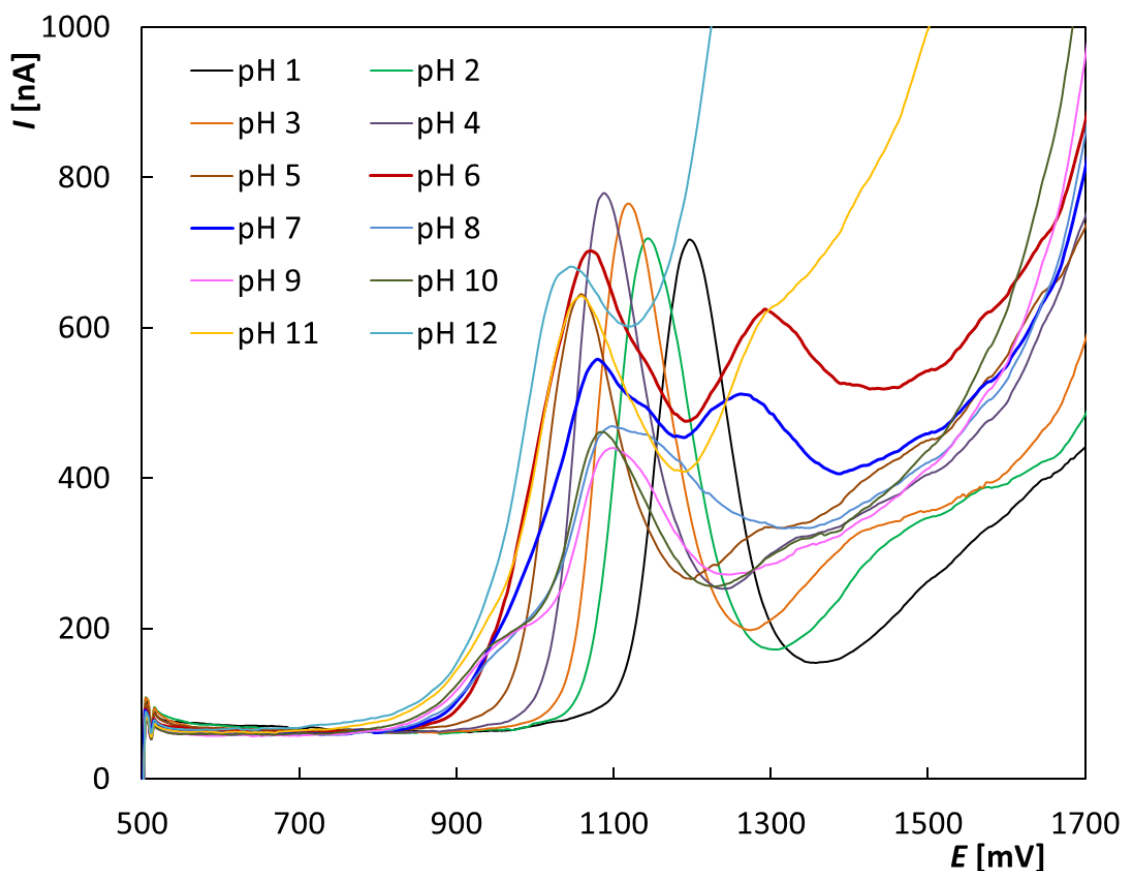
Obrázek 24 DP voltamogramy SMX a TMP v prostředí BRB zaznamenané na BDDE. Parametry: elektrolyt: BRB (pH 2), $E_{poč} = +500$ mV, $E_{kon} = +1800$ mV, $v = 40$ mV/s, výška pulzu = +50 mV, šířka pulzu = 20 ms, $c_{SMX} = 5 \times 10^{-6}$ mol/l, $c_{TMP} = 1 \times 10^{-6}$ mol/l.

3.4.2. Analýza směsi sulfamethoxazolu a trimethoprimu

3.4.2.1 pH základního elektrolytu

Důležitým parametrem, který může významně ovlivnit polohu oxidačních signálů analyzovaných látek je hodnota pH základního elektrolytu. Proto byly změřeny DP voltamogramy směsi SMX (5×10^{-6} mol/l) a TMP ($2,5 \times 10^{-6}$ mol/l) v prostředí 0,1 mol/l HNO₃ a BRB v rozsahu pH 2-12. Výsledné křivky jsou uvedeny na obrázku 25. V kyselém prostředí je viditelný pouze jeden ostrý pík pro obě látky. Se zvyšujícím se pH se proudová odezva rozšiřuje a postupně se objevují 2 maxima, která jsou nejvýraznější v neutrálním prostředí o pH 6 a 7 (červená a modrá křivka na obrázku 25). Bylo potvrzeno, že v případě prvního maxima se jedná o oxidaci SMX (+1050 mV) a druhý vrchol odpovídá oxidaci TMP

(+1300 mV). V bazickém prostředí se separace signálů opět zhoršila a proudová odezva SMX významně klesala.

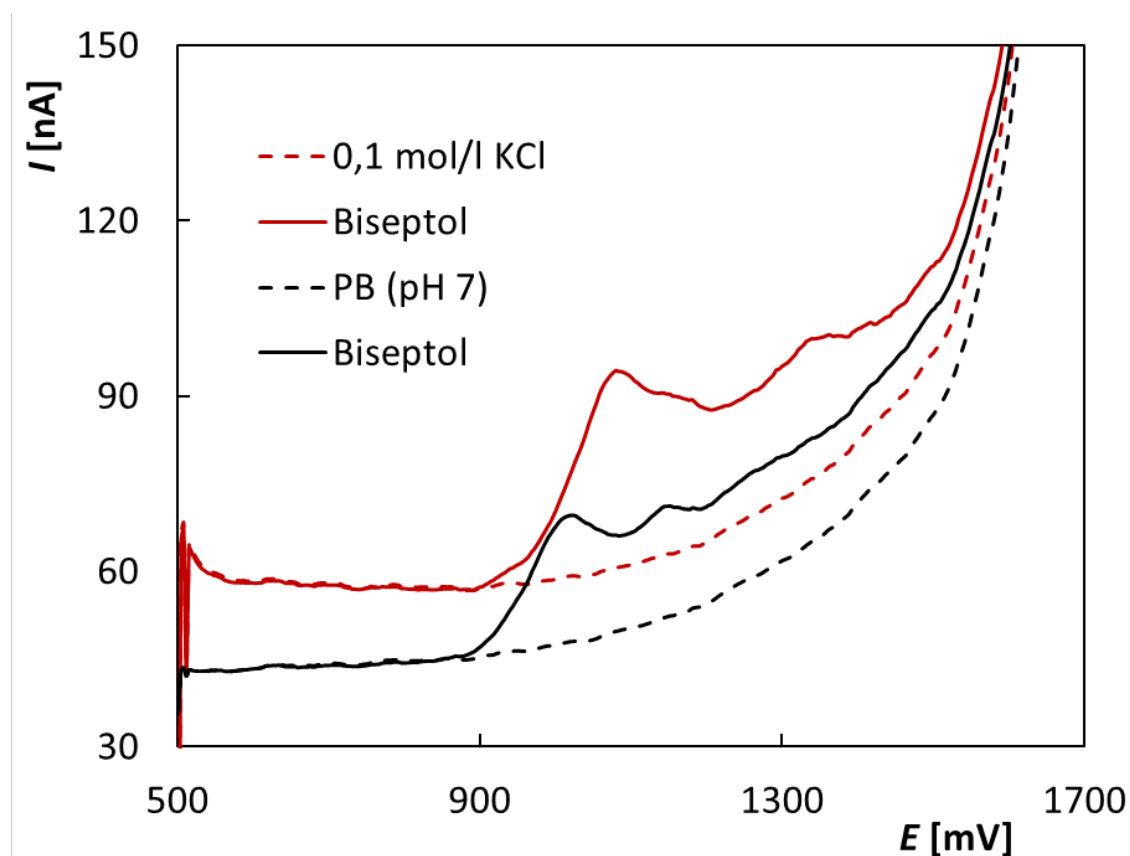


Obrázek 25 DP voltamogramy SMX o koncentraci 5×10^{-6} mol/l zaznamenané na BDDE v přítomnosti TMP o koncentraci $2,5 \times 10^{-6}$ v závislosti na pH. Parametry: elektrolyt: 0,1 mol/l HNO_3 (pH 1), BRB (pH 2-12), $E_{\text{poč}} = +500$ mV, $E_{\text{kon}} = +1800$ mV, $v = 40$ mV/s, výška pulzu = +50 mV, šířka pulzu = 50 ms.

3.4.2.2 Složení základního elektrolytu

Jak vyplývá z předchozí kapitoly, nejlepší separace signálů SMX a TMP byla zaznamenána v neutrálním prostředí. V dalším kroku byl testován vliv složení základního elektrolytu na tvar voltametrické křivky roztoku farmaceutického přípravku Biseptolu. Vedle BRB byly testovány následující roztoky: KCl (0,1 mol/l), PB (0,1 mol/l, pH 7,05) a KSCN (0,1 mol/l) pro neutrální prostředí, AcB (pH 5) pro slabě kyselé prostředí, BB (1 mol/l), NaOH (0,1 mol/l), resp. AB (pH 10) pro alkalické prostředí. Měření probíhalo při dříve optimalizovaných parametrech DPV. Měření probíhalo vždy v 10 ml základního elektrolytu

s přidavkem 1 μl roztoku Biseptolu a výsledná koncentrace SMX v polarografické nádobce tedy byla přibližně $1,579 \times 10^{-6}$ mol/l (vypočteno na základě obsahu látky v tabletě deklarovaného výrobcem). V některých testovaných prostředích (NaOH, AB, KSCN) nebyla zaznamenána žádná proudová odezva sledovaných látek a v některých byl signál jen velmi špatně vyhodnotitelný. Nejlépe vyvinutý, resp. oddělený pík SMX byl pozorován opět v neutrálním prostředí KCl a PB. Výsledné voltamogramy pro tyto dva elektrolyty jsou zobrazeny na obrázku 26. Naopak dobře vyhodnotitelný pík TMP byl pozorován v prostředí BRB o pH 10, kde byl velmi potlačen pík SMX.



Obrázek 26 DP voltamogramy roztoku tablety Biseptolu ($c_{\text{SMX}} \sim 1,579 \times 10^{-6}$ mol/l) zaznamenané na BDDE v prostředí 0,1 mol/l KCl (červená křivka) a PB (pH 7, černá křivka). Parametry: $E_{\text{poč}} = +500$ mV, $E_{\text{kon}} = +1800$ mV, $v = 20$ mV/s, výška pulzu = +50 mV, šířka pulzu = 50 ms.

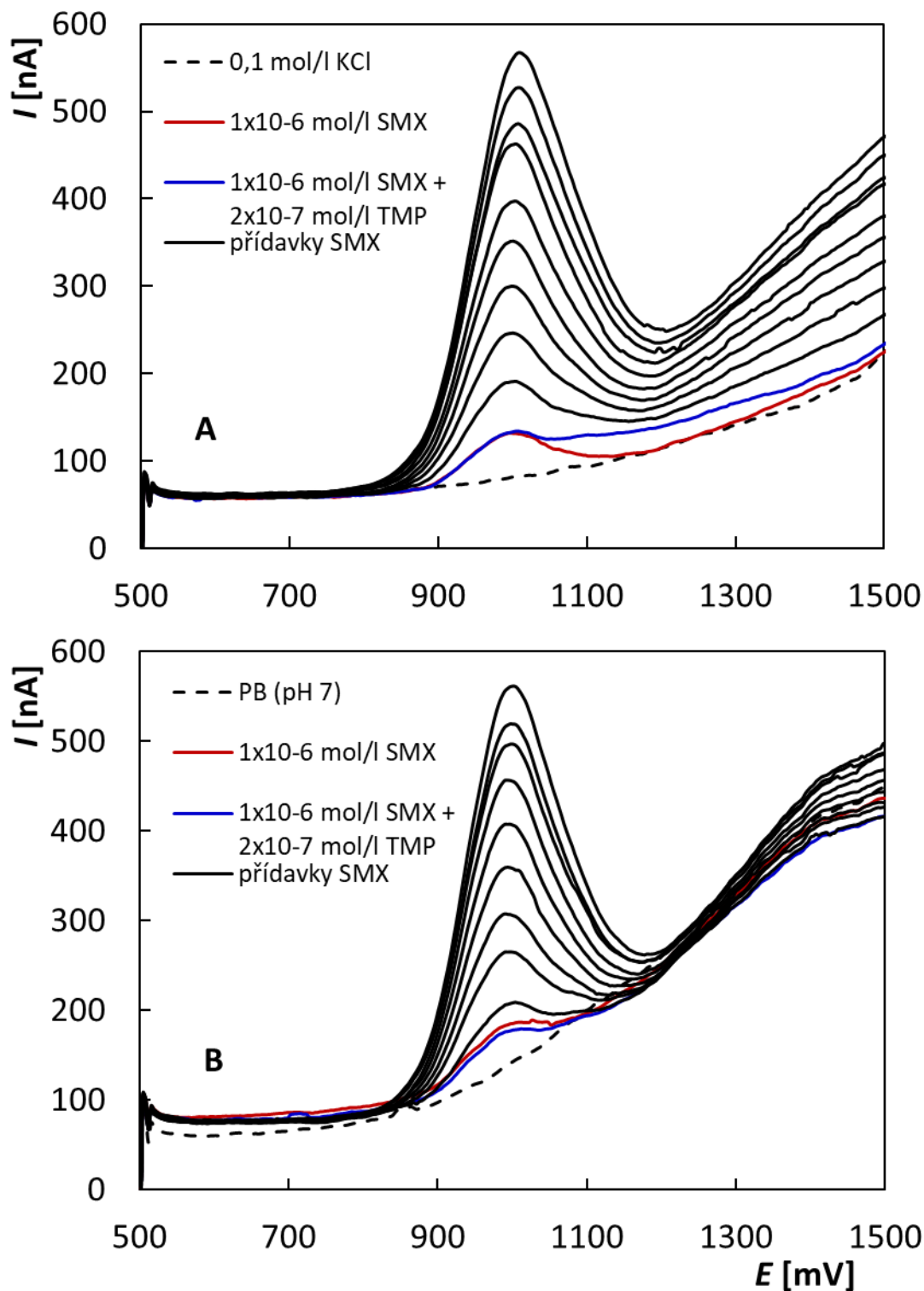
V prostředí dvou vybraných základních elektrolytů KCl (0,1 mol/l) a PB (pH 7) byly změřeny koncentrační závislosti pro SMX v přítomnosti TMP (obrázek 27). Výchozí koncentrace SMX v roztoku byla 1×10^{-6} mol/l (červené křivky v obrázku 27). K tomuto roztoku byl poté

přidán standardní roztok TMP (modré křivky) tak, že jeho výsledná koncentrace byla 5× menší, tedy 2×10^{-7} mol/l (poměr odpovídající obsahu obou látek ve farmaceutickém přípravku). Poté byla zvyšována koncentrace SMX v roztoku (černé křivky). Z obrázku je vidět, že v obou prostředích zůstal pík SMX dobře vyhodnotitelný i po přidavku TMP a jeho výška se nezměnila. Proudový signál SMX narůstal s koncentrací lineárně, což dokumentují závislosti I_p na c_{SMX} na obrázku 28. Tyto závislosti mohou být popsány následujícími rovnicemi (6) pro prostředí KCl a (7) pro PB s odpovídajícími korelačními koeficienty.

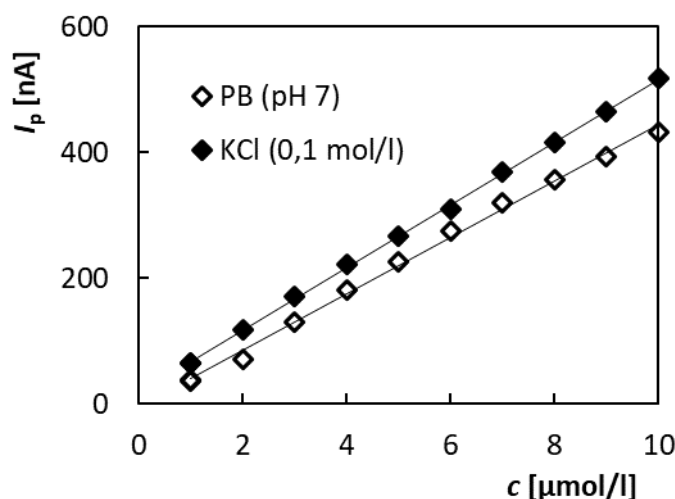
$$I_p [\text{nA}] = (45,50 \pm 0,87) c [\mu\text{mol/l}] + (0,6 \pm 3,8), r = 0,9995 \quad (6)$$

$$I_p [\text{nA}] = (40,9 \pm 1,2) c [\mu\text{mol/l}] + (-1,2 \pm 7,3), r = 0,9987 \quad (7)$$

Ze závislostí i rovnic vyplývá, že vyšší hodnota směrnice ($49,9 \pm 0,3$) byla získána v prostředí 0,1 mol/l KCl. Současně jsou píky v tomto prostředí vyšší a při práci v oblasti malých koncentrací o něco lépe vyhodnotitelné.



Obrázek 27 DP voltamogramy SMX v přítomnosti TMP zaznamenané na BDDE v závislosti na koncentraci SMX. Parametry: elektrolyt: 0,1 mol/l KCl (A) a PB (pH 7) (B), $E_{poč} = +500$ mV, $E_{kon} = +1800$ mV, $v = 20$ mV/s, výška pulzu = +50 mV, šířka pulzu = 50 ms, $c_{SMX} = 1 \times 10^{-6}$ - 1×10^{-5} mol/l, $c_{TMP} = 2 \times 10^{-7}$ mol/l.



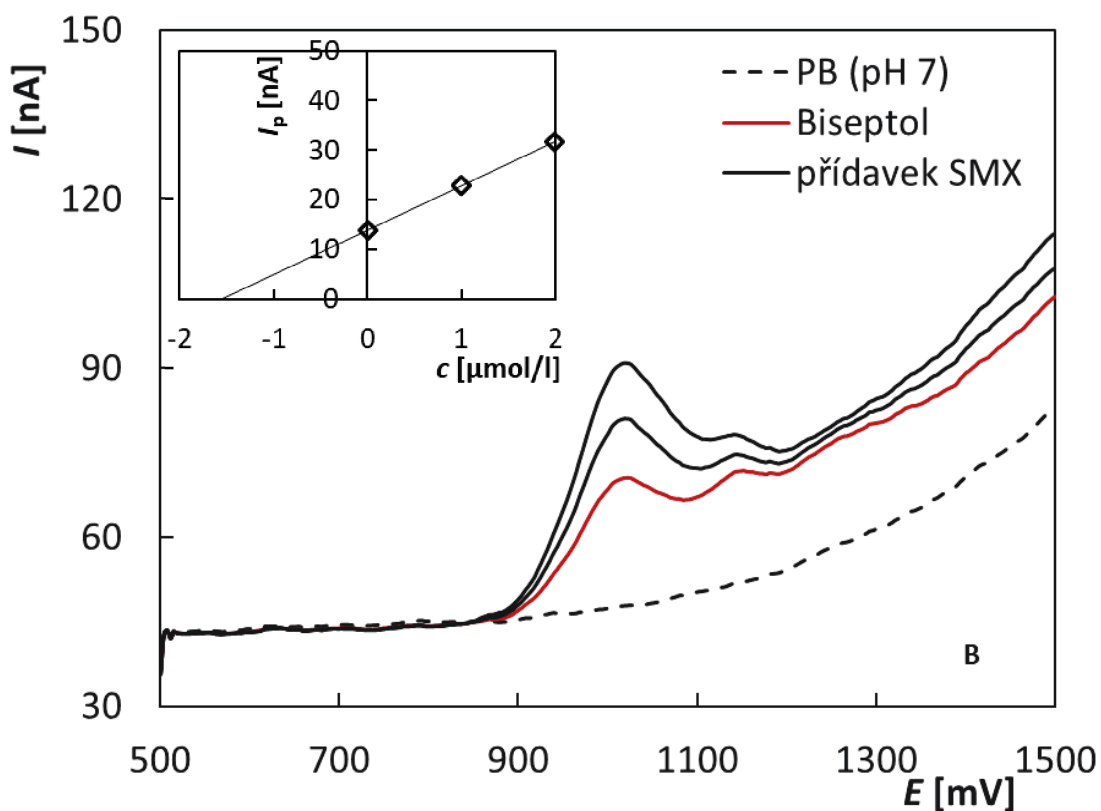
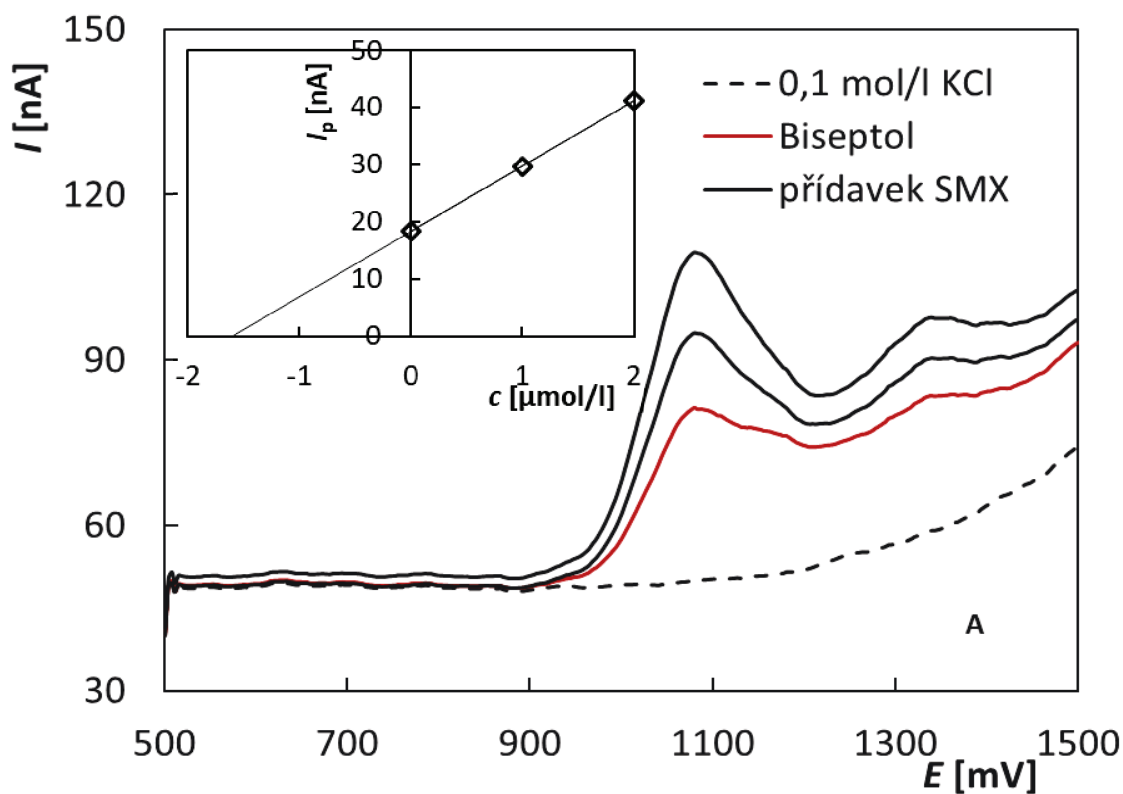
Obrázek 28 Závislosti výšky píku SMX na koncentraci získané v prostředí 0,1 mol/l KCl a PB (pH 7).

Parametry stejné jako na obrázku 27.

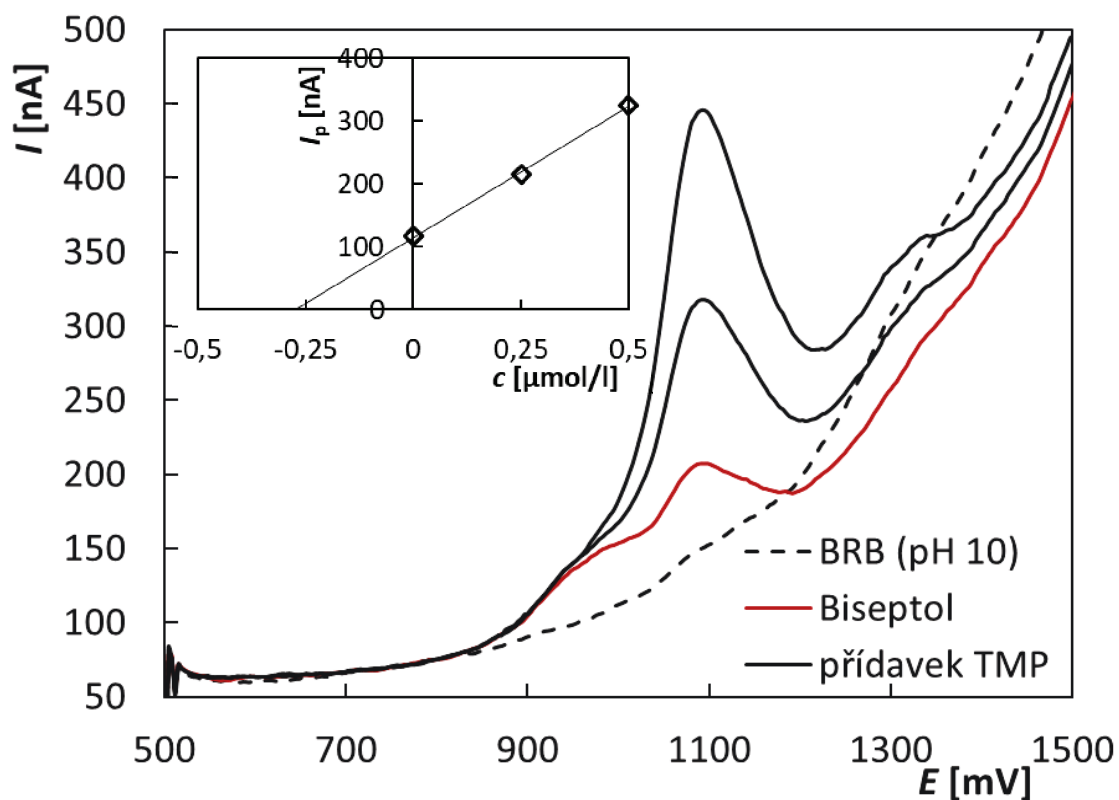
3.4.3. Analýza přípravku Biseptol

Na závěr bakalářské práce byl analyzován farmaceutický přípravek Biseptol. Jedna tableta obsahuje dle výrobce 400 mg SMX a 80 mg TMP. Na základě výše uvedených výsledků probíhalo stanovení SMX v prostředí neutrálních elektrolytů KCl, PB. K vyhodnocení byla použita metoda přidavku standardního roztoku SMX ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/l) a stanovení bylo vždy $5 \times$ zopakováno. Příklady záznamů z analýz, včetně grafického vyhodnocení metody standardního přidavku, jsou uvedeny na obrázku 29A a B. K 10 ml základního elektrolytu byl přidán 1 μl roztoku tablety Biseptolu a po provedení analýzy 2-3 přidavky standardního roztoku SMX o objemu 10 μl . Stanovení TMP probíhalo v prostředí BRB o pH 10, postup byl stejný jako v případě SMX a objem standardního přidavku byl 2,5 μl roztoku ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/l). Příklad záznamu ze stanovení TMP je uveden na obrázku 30. Výsledky pro oba analyty i různé základní elektrolyty jsou shrnuty v tabulce 6. Je zřejmé, že obsah SMX stanovený v obou testovaných prostředích byl stanoven správně (odpovídá obsahu deklarovanému výrobcem) a výsledky jsou velmi dobře opakovatelné. Vyšší proudové odezvy a o něco lepší statistické parametry byly získány v prostředí 0,1 mol/l KCl. Rovněž výsledky stanovení TMP v prostředí BRB (pH 10) jsou správné.

Byl tedy splněn cíl této bakalářské práce, byla vyvinuta metoda vhodná pro stanovení SMX použitelná pro analýzu farmaceutických přípravků, které obsahují směs účinných látek SMX a TMP.



Obrázek 29 Stanovení SMX v přípravku Bisepitol s využitím DPV ve spojení s BDDE metodou standardního přidavku. Parametry: elektrolyt: 0,1 mol/l KCl (A) a PB (pH 7) (B), $E_{poč} = +500$ mV, $E_{kon} = +1800$ mV, $v = 40$ mV/s, výška pulzu = +50 mV, šířka pulzu = 20 ms, vzorek: $V_{elektrolyt} = 10$ ml, $V_{vzorek} = 1$ μl , standardní přidavek: $V = 10$ μl , $c_{SMX} = 1 \times 10^{-3}$ mol/l.



Obrázek 30 Stanovení TMP v přípravku Biseptol s využitím DPV ve spojení s BDDE metodou standardního přidavku. Parametry: elektrolyt: BRB (pH 10), $E_{\text{poč}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{kon}} = +1800 \text{ mV}$, $v = 40 \text{ mV/s}$, výška pulzu = $+50 \text{ mV}$, šířka pulzu = 20 ms , vzorek: $V_{\text{elektrolyt}} = 10 \text{ ml}$, $V_{\text{vzorek}} = 1 \mu\text{l}$, standardní přidavek: $V = 2,5 \mu\text{l}$, $c_{\text{TMP}} = 1 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$.

Tabulka 6 Výsledky opakovaného stanovení SMX a TMP ve farmaceutickém přípravku Biseptol

Analyt	Elektrolyt	Deklarováno [mg/Tbl]	Stanoveno [mg/Tbl]	Průměr [mg/Tbl]	Výtěžnost [%]	RSD ₅ [%]
SMX	KCl (0,1 mol/l)	400	415,2	396,6±9,6	94,4-103,8	3,64
			395,1			
			405,2			
			377,4			
			390,0			
SMX	PB (pH 7)	400	371,7	394,5±10,8	92,9-103,8	4,14
			387,5			
			402,7			
			395,1			
			415,3			
TMP	BRB (pH 10)	80	78,1	79,8±2,1	95,6-105,0	3,95
			78,2			
			76,5			
			84,0			
			82,2			

Závěr

Cílem práce bakalářské práce byl vývoj rychlé a jednoduché voltametrické metody vhodné pro stanovení sulfamethoxazolu ve farmaceutických přípravcích. Jako pracovní elektroda byla použita borem dopovaná diamantová elektroda, a to především pro její skvělé elektrochemické vlastnosti. S využitím cyklické voltametrie bylo zjištěno, že SMX poskytuje dva oxidační píky kolem potenciálů +1300 mV a +1500 mV. Sledované reakce byly ireverzibilní a řízené difuzí. Pro analytické účely byl vybrán 1 oxidační pík, který byl vyšší a lépe vyhodnotitelný.

Pro vlastní vývoj metody stanovení SMX byla použita diferenčně pulzní voltametrie, umožňující obvykle stanovení nižších koncentrací. Na základě studie závislosti voltametrického chování SMX na pH byl vybrán jako vhodný elektrolyt roztok BRB o pH 2. Následně byly zjištěny optimální parametry DPV jako je rychlost polarizace, výška a šířka pulzu. Dalším krokem bylo studium možností předúpravy povrchu pracovní elektrody a její vliv na signál SMX. Nejvhodnějším způsobem aktivace se ukázalo vložení 20 cyklických voltamogramů v rozsahu potenciálů -1000 – $+2000$ mV ($v = 100$ mV/s). Aktivace se prováděla vždy pouze na začátku práce a během měření již bylo cyklování zařazeno pouze při zhoršení odezvy elektrody, a to obvykle 5 cyklů. Vyvinutá metoda byla úspěšně aplikována při analýze modelových roztoků o různé koncentraci SMX.

Analyzovaný farmaceutický přípravek Biseptol obsahoval směs účinných látek – SMX a trimethoprim. Navíc bylo zjištěno, že obě látky poskytují oxidační signál při podobných hodnotách potenciálu. Proto byly testovány různé elektrolyty o různém složení, resp. pH a bylo nalezeno prostředí, v němž lze stanovit SMX vedle TMP (0,1 mol/l KCl nebo PB (pH 7) a naopak TMP v přítomnosti SMX (BRB (pH 10)). Na závěr byl analyzován přípravek Biseptol a byly dosaženy správné a dobře opakovatelné výsledky pro obě účinné látky.

Na závěr je tedy možné říci, že cíl bakalářské práce byl splněn, protože byla vyvinuta jednoduchá a rychlá metoda umožňující stanovení SMX ve farmaceutických přípravcích, a to i v přítomnosti TMP, s nímž tvoří směsné léčivo, tzv. kotrimoxazol.

Seznam literatury

- [1] LINCOVÁ, D., FARGHALI, H. Skupiny farmak orientované podle systémů a onemocnění. In: *Základní a aplikovaná farmakologie*, 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007, s. 498-501. ISBN 978-80-7262-373-0.
- [2] SICA, D. A. Diuretics. In: *Side Effects of Drugs Annual, volume 30*. Amsterdam: Elsevier Science, 2008, s. 252-261. ISBN 978-0-444-52767-7.
- [3] Sulfonamides [online] [cit. 15. 10. 2020]. Dostupné na: <https://www.drugs.com/drug-class/sulfonamides.html>
- [4] Sulfamethoxazole [online] [cit. 15. 10. 2020]. Dostupné na: <https://www.drugs.com/international/sulfamethoxazole.html>
- [5] SHIONOGI & CO., LTD. New sulfonamide and process for producing the same. Inventors: KANO, H., NISHIMURA, H., NAKAJIMA, K., OGATA, K. US2888455 (A). 26. 5. 1959.
- [6] SITTIG, M. Sulfamethoxazole. In: *Pharmaceutical manufacturing encyclopedia 2nd edition*. New Jersey: Noyes Publications, 1988, s. 1415. ISBN: 0-8155-1144-2.
- [7] Sulfamethoxazole [online] [cit. 15. 10. 2020]. Dostupné na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfamethoxazole#section=Impurities>
- [8] BODGE, M., CUMPSTON, A. Pharmacology of Drugs Used in Hematopoietic Cell Transplantation. In: *Hematopoietic Cell Transplantation for Malignant Conditions*. Amsterdam: Elsevier, 2019, s. 19-35. ISBN 978-0-323-56802-9.
- [9] STOCKEY, I., MARSHALL, A. Co-trimoxazole take risk of pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions into account. *The Pharmaceutical Journal*, 2009, 282, s. 172.
- [10] SHARMA, A. N., HEDAYATI, B., MESINKOVSKA, N. A, WORSWICK S. Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in pregnant patients: A systematic review. *International Journal of Women's Dermatology*, 2020, 6 (4), s. 239-247.
- [11] WANG, D. T. Magnetic Resonance Imaging of Bone Marrow: A Review – Part I. *Journal of the American Osteopathic College of Radiology*, 2012, 1 (2), s. 2-12.

- [12] NAGARAJA, P., NAIK, S. D., Shrestha, A. K., Shivakumar, A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of sulfonamides in pharmaceutical preparations. *Acta Pharmaceutica*, 2007, 57, s. 333–342.
- [13] DHAHIR, S. A., KRATOM, I. A. Micro-Spectrophotometric Determination And Cloud Point Extraction of Sulfamethoxazole in Pure Form and Pharmaceutical Preparation. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological And Chemical Sciences*, 2018, 9 (6), s. 840-858.
- [14] ADEGOKE, O. A., BABALOLA, C. P., KOTILA, O. A. Simultaneous spectrophotometric determination of trimethoprim and sulfamethoxazole following charge-transfer complexation with chloranilic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 2017, 10, s. 3848-3860.
- [15] MORA DIEZ, N., MUNOZ DE LA PENA, A., MAHEDERO GARCIA, M. C. Fluorimetric determination of sulphaguanidine and sulphamethoxazole by host-guest complexation in beta-cyclodextrin and partial least squares calibration. *Journal of Fluorescence*, 17 (3), 2007, s. 309-318.
- [16] EL-DIEN, F. A. N., MOHAMED, G. G., FRAG, E. Y. Utility of p-acceptor reagents for spectrophotometric determination of sulphonamide drugs via charge-transfer complex formation. *Chemical Papers*, 2009, 63 (6), s. 646-653.
- [17] DINC, E., KADIOGLU, Y. DEMIRKAVA, F. Continuous Wavelet Transforms for Simultaneous Spectral Determination of Trimethoprim and Sulphamethoxazole in Tablets. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2011, 8 (1), s. 90-99.
- [18] RIAD, S, M., SALEM, H., ELBALKINY, H. T. Validated univariate and multivariate spectrophotometric methods for the determination of pharmaceuticals mixture in complex wastewater, *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015, 140, s. 451-461.
- [19] SILVA, F. E. B., FERRAO, M. F., PARISOTTO, G. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in powder mixtures by attenuated total reflection-Fourier transform infrared and multivariate calibration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 49 (3), s. 800-805.

- [20] KARGOSHA, K., AHMADI S. H. Simultaneous determination of sulphamethoxazole and trimethoprim in co-trimoxazole tablets by first-derivative FTIR spectrometry. *Analytical Letters*, 1999, 32 (8), s. 1613-1626.
- [21] MAHEDERO, M. C., DIAZ, T. G., PASCUAL, S. G. Determination of sulphamethoxazole by photochemically induced fluorescence in drugs and milk. *Talanta*, 2002, 57 (1), s. 1-6.
- [22] DA SILVA, F. E. B., ZIECH, C., DIAS, Y. P. Quantitative Determination of Sulphamethoxazole and Trimethoprim in Powder Mixtures Using Raman Spectroscopy and PLS. *Latin American Journal of Pharmacy*, 2011, 30 (6), s. 1216-1220.
- [23] MOUDGIL, P., BEDI, J. S., AULAKH, B. S. Validation of HPLC Multi-residue Method for Determination of Fluoroquinolones Tetracyclines, Sulphonamides and Chloramphenicol Residues in Bovine Milk. *Food Analytical Methods*, 2019, 12 (2), s. 338-346.
- [24] DINC, E., BILGILI A., HANEDAN, B. Simultaneous determination of trimethoprim and sulphamethoxazole in veterinary formulations by chromatographic multivariate methods. *Pharmazie*, 2007, 62 (3), s. 179-184.
- [25] GOULAS, V., ANDREOU, T. A., MODITI, C. A. A rapid HPLC method for the determination of sulphonamides and trimethoprim in feed premixes. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 2014, 23 (2), s. 185-189.
- [26] ZOU, G. H., XIE, M. X., WANG, X. F. Determination of sulfonamides in animal tissues by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization of 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Journal of Separation Science*, 2007, 30 (16), s. 2647-2655.
- [27] AKAY, C., OZKAN, S. A. Simultaneous LC determination of trimethoprim and sulphamethoxazole in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis*, 2002, 30 (4), s. 1207-1213.
- [28] MOR, F., OZDEMIR, G. Determination of sulphonamides residues in cattle meats by the Charm-II system and validation with high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 2012, 134 (3), s. 1645-1649.
- [29] TAKEDA, N., AKIYAMA, Y. Rapid-determination of sulfonamides in milk using liquid-chromatographic separation and fluorescamine derivatization. *Journal of Chromatography*, 1992, 607 (1), s. 31-35.

- [30] RONN, A. M., MUTABINGWA, T. K., KREISBY, S. A reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of cotrimoxazole (trimethoprim/sulphamethoxazole) in children treated for malaria. *Therapeutic Drug Monitoring*, 1999, 21 (6), s. 609-614.
- [31] GARCIA-ALVAREZ-COQUE, M. C., SIMOALFONSO, E. F., RAMISRAMOS, G. High-performance micellar liquid-chromatography determination of sulfonamides in pharmaceutical after azodye precolumn derivatization. *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis*, 1995, 13 (3), s. 237-245.
- [32] PEREIRA, A.V., CASS, Q. B. High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk using an on-line clean-up column. *Journal of Chromatography B*, 2005, 826, s. 139-146.
- [33] TESHIMA, D., OTSUBO, K., MAKINO, K., ITOH, Y., OISHI, R. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in human plasma by capillary zone electrophoresis. *Biomedical Chromatography*, 2004, 18, s. 51–54.
- [34] ISSOPOULOS, P. B. Analysis of various very slightly water soluble drugs in micellar medium 2. Potentiometric and visual determination of sulphamethoxazole in pure form. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 1996, 354 (3), s. 378-380.
- [35] HEYROVSKÝ, J. Elektrolysa se rtuťovou kapkovou elektrodou. *Chemické listy*, 1922, 16, s. 255-264.
- [36] BUREŠ, J. Jaroslav Heyrovský [online] [cit. 15. 10. 2020]. Dostupné na: <http://www.converter.cz/nobel/heyrovsky.htm>
- [37] BAREK, J. Postavení polarografie a voltametrie na rtuťových kapkových elektrodách v moderní analytické chemii. *Chemické listy*, 1997, 91, s. 1038–1042.
- [38] KOUNAVE, S. P. Voltammetric Techniques. *Handbook of Instrumental Techniques for Analytic Chemistry*, 1997, s. 710-725.
- [39] HENZE, G. Analytic Voltammetry and Polarography. *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008, s. 409-450.
- [40] BAREK, J., OPEKAR, F., ŠTULÍK, K. Voltamtrické a polarografické metody. *Elektroanalytická chemie*. Praha: Karolinum, 2005, s. 73-120. ISBN 80-246-1146-5.

- [41] HARVEY, D. Voltammetric Methods. *Analytic Chemistry 2.0 (Harvey)*. [online]
- [42] OPEKAR, F., JELÍNEK, I., RYCHLOVSKÝ, P., PLZÁK, Z. Elektroanalytické metody. *Základní analytická chemie*. Praha: Karolinum, 2003, s. 97-103. ISBN 80-246-0553-8.
- [43] LUONG, J. H. T., MALE, K. B., GLENNON, J. D. Boron – doped diamond electrode: synthesis, characterazation, functionalization and analytic application. *The Analyst*, 2009, 134 (10), s. 1965-1979.
- [44] XU, J., YOKOTA, Y., WONG, R. A., KIM, Y., EINAGA, Y. Unusual Electrochemical Properties of Low-Doped Boron-Doped Diamond Electrodes Containing sp^2 Carbon. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142 (5), s. 2310-2316.
- [45] SWAN, M. G., RAMESHAM, R. The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline diamond thin film electrodes. *Analytical Chemistry*, 1993, 65, s. 345-351.
- [46] PECKOVÁ, K., MUSILOVÁ, J., BAREK, J. Boron-Doped Diamond Film Electrodes- New Tool for Voltammetric Determination of Organic Substances. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2009, 39, s. 148-172.
- [47] SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ, K., VOSÁHLOVÁ, J., BAREK, J., ŠLOUFOVÁ, I., PAVLOVA, E., ZAVÁZALOVÁ, J. Influence of boron content the morphological spectral and electroanalytical characteristics of anodically oxidized boron-doped diamond electrodes. *Electrochimica Acta*, 2017, 243, s. 170-182.
- [48] ŠELEŠOVSKÁ, R., KRANKOVÁ, B., ŠTĚPÁNKOVÁ, M, MARTINKOVÁ, P., JANÍKOVÁ, L., CHÝLKOVÁ, J., VOJS, M. Influence of boron content on electrochemical properties of boron-doped diamond electrodes and their utilization for leucovorin dtermination. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2018, 821, s. 2-9.
- [49] BALUCHOVÁ, S., DANHEL, A., DEJMKOVÁ, H., OSTATNÁ, V., FOJTA, M., SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ, K. Recent progress in the applications of boron doped diamond electrodes in electroanalysis of organic compounds and biomolecules – A review. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1077, s. 30-66.

- [50] BAREK, J., FISCHER, J., NAVRÁTIL, T., PECKOVÁ, K., YOSYPCHUK, B., ZIMA, J. Nontraditional Electrode Materials in Environmental Analysis of Biologically Active Organic Compounds. *Electroanalysis*, 2007, 19, s. 2003-2014.
- [51] PECKOVA, K., BAREK, J. Boron Doped Diamond Microelectrodes and Microelectrode Arrays in Organic Electrochemistry. *COC*, 2011, 15, s. 3014-3028.
- [52] MUSILOVÁ, J. Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem pro stanovení organických látek. *Chemické Listy*, 2019, 10.
- [53] MUZYKA, K., SUN, J., FERIA, T. H., LAN, Y., ZHANG, W., XU, G. Boron-doped diamond current progress and challenges in view of electroanalytical applications. *Analytical Methods*, 2019, 11, s. 397-414.
- [54] SWAIN, G. M., ANDERSON, A. B., ANGUS, J. C. Applications of diamond thin films in electrochemistry. *MRS Bulletin*, 1998, 23, s. 56-60.
- [55] NIDHEESH, P. V., DIVYAPRIYA, G., OTURAN, N., TRELLU, C., OTURAN, M. A. Environmental Applications of Boron-Doped Diamond Electrodes: 1. Applications in Water and Wastewater Treatment. *ChemElectroChem*, 2019, 6 (8), s. 2124-2142.
- [56] ARVAND, M., ANSARI, R., HEYDARI, L. Electrocatalytic oxidation and differential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole using carbon nanotube paste electrode. *Materials Science and Engineering C*, 2011, 31, s. 1819-1825.
- [57] ISSAC, S., KUMAR, K. G. Voltammetric determination of sulfamethoxazole at a multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon sensor and its application studies. *Drug Testing and Analysis*, 2009, 1, s. 350–354.
- [58] CHEN, C., CHEN, Y. C., HONG, Y. T., LEE, T. W., HUANG, J. F. Facile fabrication of ascorbic acid reduced graphene oxide-modified electrodes toward electroanalytical determination of sulfamethoxazole in aqueous environments. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 352, s. 188-197.
- [59] YARI, A., SHAMS, A. Silver-filled MWCNT nanocomposite as a sensing element for voltammetric determination of sulfamethoxazole. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1039, s. 51-58.

- [60] CESARINO, I., CESARINO, V., LANZA, M. R. V. Carbon nanotubes modified with antimony nanoparticles in a paraffin composite electrode: Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim. *Sensors and Actuators B*, 2013, 188, s. 1293-1299.
- [61] CAI, M., ZHU, L., DING, Y., WANG, J., LI, J., DU, X. Determination of sulfamethoxazole in foods based on CeO₂/chitosan nanocomposite-modified electrodes. *Materials Science and Engineering C*, 2012, 32, s. 2623–2627.
- [62] CHASTA, H., GOYAL, R. N. A Simple and Sensitive Poly-1,5-Diaminophthalene Modified Sensor for the Determination of Sulfamethoxazole in Biological Samples. *Electroanalysis*, 2015, 27, s. 1229-1237.
- [63] JOSEPH, R., KUMAR, K. G. Differential pulse voltammetric determination and catalytic oxidation of sulfamethoxazole using [5,10,15,20-tetrakis (3-methoxy-4-hydroxy phenyl) porphyrinato] Cu (II) modified carbon paste sensor. *Drug Testing Analysis*, 2010, 2, s. 278-283.
- [64] ROMÁN, L., ALONSO-LOMILLO, M. A., DOMINGUEZ-RENEADO, O., ARCOS-MARTINEZ, M. J. Tyrosinase based biosensor for the electrochemical determination of sulfamethoxazole. *Sensors and Actuators B*, 2016, 227, s. 48-53.
- [65] Eco-Tribo Polarograph [online] [cit. 24. 5. 2021]. Dostupné na: <https://www.alibaba.com/eco--tribo-polarograph-suppliers.html>.
- [66] Lékárna Bella [online] [cit. 24. 5. 2021]. Dostupné na: <https://www.lekarna-bella.cz/zbozi/3760486/biseptol-400mg-80mg-tbl-nob-28>.